

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1898-1899.

N^o 5.

Recherches sur la Cristallisation de l'Oxyhémoglobine
et de l'Hémoglobine.

THÈSE

POUR

l'Obtention du Diplôme supérieur de Pharmacien de 1^{re} classe

Présentée et soutenue le 25 Juillet 1899

PAR

Charles ROUCHY

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ASSISTANT DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE A L'UNIVERSITÉ DE FRIBOURG (SUISSE)

né à Mauriac (Cantal) le 30 Décembre 1871.

JURY : { MM. BOURQUELOT, *Président.*
BEAUREGARD, *Professeur.*
BERTHELOT, *Agrégé.*

OLLIER-HENRY

LIBRAIRE-ÉDITEUR

11 ET 13, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE
PARIS

—
1899

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. G. PLANCHON, Directeur, O ,  I.
A. MILNE-EDWARDS, Assesseur, Membre de l'Institut, C ,  I.
É. MADOULÉ, Secrétaire,  I.

PROFESSEURS

MM. PLANCHON, O ,  I Matière médicale.
A. MILNE-EDWARDS, Membre
de l'Institut, C ,  I Zoologie.
RICHE, O ,  I Chimie minérale.
JUNGFLEISCH, ,  I Chimie organique.
LE ROUX, O ,  I Physique.
BOUCHARDAT, ,  I Hydrologie et Minéralogie.
PRUNIER, ,  I Pharmacie chimique.
MOISSAN, Membre de l'Insti-
tut, O ,  I Toxicologie.
GUIGNARD, Membre de l'Insti-
tut, ,  I Botanique générale.
VILLIERS-MORIAMÉ,  I Chimie analytique.
BOURQUELOT, ,  I Pharmacie galénique.
BEAUREGARD, ,  I Cryptogamie.

Directeur et professeur honoraires : M. CHATIN, Membre de l'Institut, O ,  I.
Professeurs honoraires : MM. BERTHELOT, Membre de l'Institut, G. C. ,  I.
MARCHAND,  I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. LEIDIÉ,  I.		MM. BERTHELOT,  A.
GAUTIER,  A.		RADAIS,  A.
OUVRARD,  I.		

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. GRIMBERT Chimie générale.
LEXTREIT,  I Chimie analytique.
PERROT,  A Micrographie.
QUESNEVILLE,  I Physique.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. CHASTAING,  I.
Bibliothécaire : M. DORVEAUX,  I.

A mon Maître,

MONSIEUR ARTHUS

Professeur à l'Université de Fribourg (Suisse)

Hommage de reconnaissance.

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1898-1899.

N° 6.

Recherches sur la Cristallisation de l'Oxyhémoglobine
et de l'Hémoglobine.

THÈSE

POUR

l'Obtention du Diplôme supérieur de Pharmacien de 1^{re} classe

Présentée et soutenue le 25 Juillet 1899

PAR

Charles ROUCHY

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ASSISTANT DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE A L'UNIVERSITÉ DE FRIBOURG (SUISSE)

né à Mauriac (Cantal) le 30 Décembre 1871.



JURY : { MM. BOURQUELOT, *Président.*
BEAUREGARD, *Professeur.*
BERTHELOT, *Agrégé.*

OLLIER-HENRY

LIBRAIRE-ÉDITEUR

11 ET 13, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE
PARIS

1899

INTRODUCTION

Parmi les substances protéiques, l'oxyhémoglobine est incontestablement la mieux connue, au point de vue de sa composition et de sa constitution chimique. Elle doit cet avantage, à la propriété qu'elle possède de cristalliser : on a pu, par des cristallisations et redissolutions successives, l'obtenir pure, débarrassée des corps qui l'accompagnent; tandis que les autres substances protéiques, colloïdes et amorphes, n'ont pu, jusqu'à présent, être isolées les unes des autres; et qu'il n'a jamais été possible d'affirmer leur état de pureté chimique.

Aussi, s'est-on efforcé de préparer de l'oxyhémoglobine pure en grande quantité, et de perfectionner ces méthodes de cristallisation.

Deux procédés peuvent être employés pour obtenir l'oxyhémoglobine cristallisée : la concentration de ses solutions, et leur précipitation par un agent convenablement choisi.

La concentration des solutions ne donne, en général, que des résultats peu satisfaisants : l'oxyhémoglobine se dépose le plus souvent sous la forme de granules amorphes, agglomérés en couche gluante à la surface de la solution. Le second procédé est le seul qui soit d'une application pratique. On emploie comme agent précipitant, l'alcool éthylique, et on favorise la formation et le dépôt des cristaux par le refroidissement des liqueurs.

Ces quelques considérations nous expliquent la raison des divers détails de la préparation classique des cristaux d'oxyhémoglobine telle qu'elle a été proposée et effectuée pour la première fois par Hoppe-Seyler (1).

On sait que Hoppe-Seyler procède de la manière suivante :

Il mélange le sang défibriné à 10 volumes d'une solution de chlorure de sodium obtenue en ajoutant 1 volume de la solution saturée à 10 volumes d'eau. Il abandonne au repos ce mélange pendant 1 ou 2 jours dans un lieu froid pour permettre aux globules de se reposer, ou bien il favorise le dépôt des globules rouges par l'emploi de la force centrifuge prolongé au besoin pendant 2 ou 3 heures. Il sépare le liquide de la bouillie épaisse des globules, mélange cette dernière à la solution chlorurée sodique, sépare de nouveau les globules de la solution, et répète cette série d'opérations jusqu'à lavage complet des globules.

La bouillie globulaire est alors additionnée d'un peu d'eau et d'éther, le tout est agité, et la liqueur ainsi obtenue, de coloration rouge foncé, est abandonnée au refroidissement jusqu'à 0°. Elle est alors traitée par le quart de son volume d'Alcool éthylique refroidi à 0°, et le mélange est abandonné pendant quelques jours à une température comprise entre — 2° et — 10°. Des cristaux se forment et se déposent, on les sépare du liquide par filtration à basse température; on les presse entre des lames de papier-filtre; et pour obtenir une substance plus pure on les redissout dans l'eau et on les fait recristalliser comme précédemment.

Tous les procédés actuellement employés pour la pré-

(1) *Beiträge zur Kenntniss des Blutes des Menschen und der Wirbelthiere. — Med. chem. Unters. fasc. 2 (1867).*

ration des cristaux d'oxyhémoglobine ne diffèrent de celui d'Hoppe-Seyler que par des détails sans importance.

Je me suis proposé d'examiner, avec quelque détail, les différents temps de cette préparation ; et de rechercher les conditions les plus favorables pour l'obtention des cristaux d'oxyhémoglobine. J'ai cherché, en particulier, à résoudre les questions suivantes :

Y a-t-il avantage à laquer les globules sanguins avant le traitement par l'alcool?

Quel est le procédé de laquage le plus recommandable?

L'alcool éthylique est-il le précipitant de choix ; et ne pourrait-on pas avantageusement lui substituer quelque autre substance?

Quel rôle peuvent jouer les sels neutres alcalins et alcalino-terreux dans la production des cristaux d'oxyhémoglobine ? etc.

Dans le cours de mes recherches, j'ai été amené à étudier plus particulièrement certaines propriétés de l'oxyhémoglobine cristallisée ; et j'ai été conduit à des résultats qui font ressortir plus nettement encore qu'on ne l'avait fait, le double caractère colloïde et cristalloïde de cette substance.

Ce travail a été fait à l'Institut de physiologie de l'Université de Fribourg, sous la direction de M. le professeur Arthus.

Je suis heureux de pouvoir lui dire, ici, toute ma reconnaissance pour sa bienveillance très grande et de le remercier de toutes les bontés qu'il a eues pour moi.

Que Monsieur le Professeur Dastre veuille bien agréer l'expression de ma vive gratitude, pour l'accueil aimable que j'ai trouvé dans son laboratoire de la Sorbonne.

CHAPITRE PREMIER

Influence du laquage des globules sanguins sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine

L'oxyhémoglobine se trouve dans le sang et dans le muscle ; mais on n'a jamais recours au muscle pour la préparer, parce qu'elle y est en quantité relativement faible, et mêlée à de nombreuses substances qui en rendraient la préparation et la cristallisation extrêmement compliquées et difficiles. On emploie le sang comme matière première.

L'oxyhémoglobine dans le sang normal, est fixée comme une teinture sur les globules rouges qui la retiennent fortement, bien qu'elle soit facilement soluble dans le plasma. Il y a avantage, et souvent même nécessité, à séparer ces globules du plasma et du sérum, parce que l'alcool entraînerait, en même temps que l'oxyhémoglobine, les substances protéiques du liquide, dont le précipité amorphe retiendrait l'oxyhémoglobine, comme une teinture amorphe. Ce n'est qu'avec les sangs dont l'oxyhémoglobine est facilement précipitable par l'alcool (tels que les sangs d'Écureuil et de Cobaye) qu'on peut traiter ce sang directement et avant toute préparation par l'alcool avec chance d'obtenir un résultat favorable.

Il est bon, en outre, de laquer les globules, c'est-à-dire de déterminer la rupture de l'union intime de la substance globulaire et du pigment, afin d'éviter l'entraî-

nement dans le précipité du stroma globulaire lui-même.

On peut obtenir le laquage des globules par différents procédés. Si on soumet des globules sanguins à l'action d'un refroidissement brusque et considérable; et si on réchauffe rapidement la masse congelée, on détermine en général la mise en liberté du pigment. Le même résultat s'obtient par addition d'une quantité suffisante d'eau distillée aux globules sanguins, (en général, 2 volumes d'eau distillée suffisent à laquer 1 volume de globules.)

On peut enfin laquer les globules par addition d'une très petite quantité d'eau et d'une petite quantité d'éther; ou même par simple addition d'éther. Ce sont là, non pas les seuls procédés, mais les procédés le plus généralement employés pour laquer les globules.

Y a-t-il avantage à se servir de l'un de ces procédés plutôt que des autres, lorsqu'on se propose de préparer des cristaux d'oxyhémoglobine? Pour résoudre cette question, j'ai essayé la préparation des cristaux sur des globules laqués par les différents procédés que je viens de mentionner.

Expérience. — Du sang est extrait de l'artère fémorale d'un Chien soumis à l'anesthésie mixte-atropo-morphine, chloroforme (1). Ce sang est aussitôt défibriné par battage, et séparé de la fibrine produite par filtration sur coton de verre. On soumet ce sang à l'action de la force centrifuge jusqu'à ce que les globules se soient déposés nettement au fond du tube et que leur couche ne change

(1) On sait que le chien qui a reçu 1^{er}g de morphine et 1^{mm} d'atropine par kilog. présente une anesthésie profonde lorsqu'il a respiré quelques gouttes de chloroforme. Si l'animal ainsi anesthésié respire pendant quelques minutes à l'air libre, on peut admettre qu'il a éliminé la presque totalité du chloroforme absorbé. De la sorte, il n'y a point d'impuretés chloroformiques dans le sang.

pas d'épaisseur par une nouvelle centrifugation. On décante le sérum surnageant, et on procède au lavage des globules. Ceux-ci sont, à cet effet, mélangés à un égal volume d'eau salée à 1 %; et le mélange vigoureusement agité est de nouveau soumis à la centrifugation. On procède à une nouvelle décantation et on répète le même traitement une fois encore.

A volumes égaux de ces globules, on ajoute pour les laquer des quantités croissantes d'eau distillée; puis à volumes égaux de ces mélanges, on ajoute quantités égales d'alcool, pour en précipiter le pigment. On prépare donc les mélanges suivants :

<i>a</i>	5 ^{cc} de globules lavés.	+	5 ^{cc} d'eau
<i>b</i>	5 ^{cc} —		20 ^{cc} —
<i>c</i>	5 ^{cc} —		50 ^{cc} —
<i>d</i>	5 ^{cc} —		200 ^{cc} —

A 10^{cc} de chacun de ces mélanges, on ajoute 2^{cc} d'Alcool éthylique à 95 %; et on les abandonne pendant 24 heures à une température comprise entre — 3° et — 5°. On examine alors au microscope une goutte de chacun des liquides. On constate qu'il s'est formé des cristaux abondants dans les mélanges *a* et *b*; qu'il ne s'en est pas formé dans les mélanges *c* et *d*.

D'où cette conclusion. Lorsqu'on laque des globules par l'eau distillée, il est indispensable d'employer une petite quantité d'eau, si l'on veut obtenir une précipitation cristalline d'oxyhémoglobine par addition d'alcool. Cette conclusion peut se présenter encore sous la forme suivante : Pour une même quantité d'alcool précipitant, la précipitation cristalline de l'oxyhémoglobine se fait mieux dans les solutions concentrées que dans les solutions diluées.

Expérience. — On recueille du sang, par l'artère fémoral d'un chien anesthésié; on défibrine ce sang, on

sépare les globules par centrifugation, et on les lave à l'eau salée, comme il a été dit précédemment.

On se propose de comparer l'action de l'eau seule employée comme agent de laquage, à l'action d'un mélange d'eau et d'éther; ce dernier étant employé en grande proportion.

On prépare donc les mélanges suivants :

<i>a</i>	5 ^{cc} de globules lavés +	5 ^{cc} d'eau
<i>b</i>	5 ^{cc} — — — — —	20 ^{cc} —
<i>c</i>	5 ^{cc} — — — — —	50 ^{cc} —
<i>d</i>	5 ^{cc} — — — — —	200 ^{cc} —

et l'on fait ainsi 3 séries semblables, soit série A, série B, série C, composées chacune des 4 mélanges *a. b. c. d.* Les mélanges de la série A ne reçoivent point d'éther; les mélanges de la série B sont additionnés chacun de 1^{re} d'éther; les mélanges de la série C reçoivent chacun 5^{cc} d'éther.

Dans 10^{cc} de chacune des liqueurs Aa, Ab... Ba, Bb, Ca, Cb, etc... on ajoute 2^{cc} d'Alcool éthylique à 95 %; on abandonne pendant 24 heures à — 5°, et on examine au microscope une goutte de chaque liqueur :

On observe des cristaux dans les mélanges Aa, Ab et Bb. Dans tous les autres mélanges il n'y a pas de cristaux en quantité appréciable. Les mélanges Ac et Ad ne contiennent ni cristaux ni dépôts amorphes. Le mélange Ba contient quelques rares cristaux, très fins, aiguillés, et quelques dépôts amorphes; les mélanges Bc et Bd ne contiennent ni cristaux ni dépôts. Les mélanges de la série C ne contiennent pas de cristaux; mais Ca Cb sont remplis de dépôts amorphes.

D'où cette conclusion: L'addition d'éther, aux doses ci-dessus indiquées, à l'eau distillée employée pour laquer les globules est désavantageux pour la cristallisation de l'oxyhémoglobine. Nous disons, l'addition

d'éther à l'eau ; nous ne disons pas le laquage par l'éther, est moins avantageux que le laquage à l'eau. Lorsque le sang a été laqué par l'eau, il n'y a aucun avantage à employer en outre de l'éther.

Expérience. — Des globules de sang de Chien, séparés du sérum et lavés comme dans les précédentes expériences, sont laqués par addition de 2 vol. d'eau distillée. On prépare les mélanges suivants :

SÉRIE A

α 20 ^{cc} de globules laqués + 4 ^{cc} d'alcool éthylique à 95 %			
β 20 ^{cc}	—	8	—
γ 20 ^{cc}	—	12	—
δ 20 ^{cc}	—	16	—
ϵ 20 ^{cc}	—	20	—

SÉRIE B

α 20 ^{cc} globules laqués + 0 ^{cc} 4 d'éther + 4 ^{cc} d'alc. éthyl. à 95 %			
β 20 ^{cc}	—	8 ^{cc}	—
γ 20 ^{cc}	—	12 ^{cc}	—
δ 20 ^{cc}	—	16 ^{cc}	—
ϵ 20 ^{cc}	—	20 ^{cc}	—

On abandonne à une température inférieure à 0° pendant 24 heures. L'examen microscopique révèle la présence de cristaux très nombreux, et à contours très nets dans les mélanges A_α et A_β . Les cristaux sont plus petits, moins nets et moins nombreux dans A_γ et B_α ; ils sont très fins et très rares dans B_β et B_γ . Dans A_δ et B_δ il n'y a que de très rares aiguilles accompagnées de quelques dépôts amorphes.

Si l'on compare les termes homologues des deux séries on constate nettement l'action défavorable de l'éther, même à des doses aussi petites que 1,50 sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine de chien.

Expérience. — Du sang de Bœuf est défibriné par battage, débarrassé de sa fibrine par filtration sur coton de verre et soumis à la centrifugation. Les globules sépa-

rés du sérum sont lavés à l'eau salée à 1 % à 3 reprises successives et chaque fois séparés de la liqueur par centrifugation.

On fait le laquage de ces globules, soit par refroidissement, soit par addition d'eau distillée, soit par addition d'éther soit par addition d'eau et d'éther.

Pour laquer par refroidissement, les globules sont placés dans un petit vase en verre de Bohême plongeant dans un mélange réfrigérant et refroidis rapidement à — 8 degrés, puis brusquement ramenés à + 45 degrés. L'opération étant répétée 3 fois le laquage est total.

Le laquage à l'eau a été obtenu par addition de 1 vol. ou de 2 vol. ou de 4 vol. d'eau distillée à 1 vol. de globules.

Le laquage par l'éther a été obtenu en ajoutant de petites portions d'éther aux globules, et agitant vigoureusement après chaque nouvelle addition.

Enfin le laquage par l'eau et l'éther a été obtenu en ajoutant à 1 vol. de globules, 1 vol. d'eau distillée, et de l'éther dans les proportions suivantes : 1/200, 1/100, 1/50, 1/20 et 1/10 de volume.

A 10 centimètres cubes de chacun des liquides obtenus par l'un de ces procédés on ajoute respectivement 2^{cc}; 2^{cc},5; 3^{cc}; 3^{cc},5 d'alcool éthylique à 95 %.

On maintient ces mélanges à une température voisine de 0 degré pendant 3 jours : on ne constate l'existence de cristaux dans aucun des mélanges. On les porte alors à une température de : — 10 degrés environ pendant 24 heures, et on trouve des cristaux :

1° Dans le mélange provenant des globules laqués par refroidissement, additionnés de 3^{cc} d'alcool pour 10^{cc} de globules laqués ;

2° Dans le mélange provenant des globules laqués par l'éther seul additionnés de 2^{cc},5 d'alcool pour 10^{cc} de globules laqués.

Dans aucun autre mélange on ne trouve de cristaux.

Cette expérience démontre le rôle désavantageux de la dilution dans la préparation des cristaux d'oxyhémoglobine du Bœuf. Seuls les mélanges dans lesquels il n'y a point eu addition d'eau et par conséquent dilution de la solution du pigment, sont susceptibles d'être amenés à cristallisation.

Expérience. — Du sang de Cheval, obtenu défibriné par battage, est centrifugé ; les globules séparés du sérum sont lavés à l'eau salée à 1 % et centrifugés de nouveau. Après 3 lavages, les globules sont laqués à l'éther seul. A cet effet, à 600^{cc} de globules lavés on ajoute 1^{cc} d'éther et on agite vigoureusement. On ajoute encore 10^{cc} d'éther, et on agite de nouveau, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'on en ait ajouté 130^{cc} : le laquage est alors parfait.

On divise ces globules laqués en 5 séries que nous désignerons par les lettres A, B, C, D, E.

Les globules laqués par l'éther seul constituent la série A. Pour obtenir les autres séries, on ajoute respectivement à 1 vol. de globules laqués, 1/2 vol., 1 vol., 2 vol., et 4 vol. d'eau distillée. Dans chacune de ces séries, on prépare 5 mélanges *a b c d e* contenant des proportions variables d'alcool. On aura donc les séries :

A : globules laqués par éther seul

B	—	—	—	—	1 vol + 1/2 vol d'eau distillée.
C	—	—	—	—	1 —
D	—	—	—	—	2 —
E	—	—	—	—	4 —

contenant chacune les mélanges suivants :

<i>a</i>	Globules laqués	10 ^{cc} + alcool	1 ^{cc} + eau	4 ^{cc}
<i>b</i>	—	—	2 ^{cc} —	3 ^{cc}
<i>c</i>	—	—	3 ^{cc} —	2 ^{cc}
<i>d</i>	—	—	4 ^{cc} —	1 ^{cc}
<i>e</i>	—	—	5 ^{cc}	

Tous ces mélanges sont abandonnés pendant une nuit à une température de -5 à -8 degrés.

Au bout de ce temps, on ne trouve point de cristaux dans les séries C, D, E; on en trouve au contraire dans les séries A et B.

Dans la série A, le mélange *Aa* n'en contient pas; le mélange *Ab* contient quelques rares aiguilles cristallines; le mélange *Ac* contient quelques aiguilles et quelques cristaux; le mélange *Ad* contient des cristaux; enfin, dans *Ae* il y a des cristaux très gros et très nombreux.

Dans la série B, le mélange *Ba* ne renferme ni aiguilles, ni cristaux. Il y a de très fines aiguilles dans *Bc*, *Bd* et *Be*; dans *Bd* il y a, en outre, quelques cristaux.

D'où cette conclusion: la cristallisation de l'oxyhémoglobine de Cheval, se fait d'autant mieux, toutes autres conditions égales d'ailleurs, que la liqueur est moins diluée.

On conserve à la température de -5 à -8 degrés les mélanges des séries C, D et E, dans lesquels après 24 heures on n'avait pas de cristaux. On les examine de nouveau après 8 jours et on constate les faits suivants:

Dans la série C, le mélange *Ca* ne contient pas de cristaux, les mélanges *Cb* et *Cc* renferment de fines aiguilles cristallines nombreuses; le mélange *Ce* contient outre ces fines aiguilles des cristaux à arêtes visibles; enfin le mélange *Cd* contient de grosses aiguilles et de nombreux cristaux.

Dans la série D le mélange *Da* ne contient point de cristaux, point d'aiguilles cristallines: dans *Db* il y a des aiguilles fines et nombreuses; dans *Dc* elles sont plus grosses; dans *Dd* elles sont plus grosses encore et accompagnées de cristaux et de quelques dépôts amorphes.

Dans la série E le mélange *Ea* ne contient ni cristaux

ni aiguilles ; les mélanges *Eb*, *Ec* et *Ed* contiennent des aiguilles cristallines, pas de cristaux.

Donc, ici encore, après un long séjour à basse température, la cristallisation est d'autant meilleure, toutes autres conditions égales, que la dilution est moindre.

Expérience. — Pour laquer les globules du sang de Poulet (reçu dans une solution de fluorure de sodium à 1 %) il faut, après les avoir séparés par centrifugation, et lavés, leur ajouter 3 vol. d'eau distillée, au moins.

A cette dilution, on obtient par addition d'une proportion convenable d'alcool, des cristaux d'oxyhémoglobine.

Nous rapportons ici cette expérience pour bien établir que les conditions du laquage peuvent varier suivant le sang considéré, sans que la cristallisation soit empêchée pour les unes, alors qu'elle l'est pour les autres.

Expérience. — Dans du sang d'Écureuil laqué par 1 vol. d'eau distillée pour 1 vol de globules, on constate la production, à la température du laboratoire, de formes cristallines très nettes. Dans ce cas, le laquage seul a suffi pour produire la cristallisation.

En résumé : dans la préparation des cristaux d'oxyhémoglobine, il y a toujours avantage à laquer les globules avec la dilution la plus petite possible, la précipitation cristalline se faisant d'autant mieux que la solution d'oxyhémoglobine est plus concentrée.

L'éther est avantageux à employer, parce qu'il permet le laquage sans dilution notable et seulement pour cette condition, car par lui-même, l'éther joue un rôle défavorable dans la cristallisation.

CHAPITRE II

Influence de la quantité d'Alcool précipitant sur la formation des cristaux d'oxyhémoglobine

Les conditions dans lesquelles doit être fait le laquage pour permettre d'obtenir des cristaux d'oxyhémoglobine étant ainsi connues, j'ai recherché dans quelles proportions et de quelle manière on devait employer l'Alcool éthylique pour avoir sous forme cristallisée la matière colorante du sang. A cet effet, j'ai traité les globules convenablement laqués du sang de divers animaux par des quantités variées d'Alcool éthylique à 95 degrés.

Expérience. — On a préparé l'artère fémorale d'un Chien, et reçu le sang dans une solution d'oxalate d'ammoniaque à 1 %, assez abondante pour en empêcher la coagulation. Ce mélange est soumis à la centrifugation, et les globules séparés du sérum, sont additionnés de leur volume d'eau salée à 1 %, vigoureusement agités puis centrifugés ; et on répète ce lavage à 2 reprises. On laque ces globules complètement débarrassés des matières albuminoïdes par leur vol. d'eau distillée ; et on les traite par l'Alcool éthylique à 95 degrés. On le verse par centimètres cubes à l'aide d'une burette graduée, en ayant le soin d'agiter chaque fois. Sans cette précaution l'Alcool arrivant en grande quantité, au contact de l'oxyhémoglobine la décomposerait, empêchant ainsi toute cristallisation.

On a de la sorte les mélanges suivants où la proportion d'alcool est de 1, 2, 3, 4, 5 vol. pour 10 vol. de globules laqués.

<i>a</i>	30 ^{cc}	de globules laqués	+	3 ^{cc}	d'alcool éthylique	+	12 ^{cc}	d'eau
<i>b</i>	30 ^{cc}	—	—	6	—	—	9	—
<i>c</i>	30 ^{cc}	—	—	9	—	—	6	—
<i>d</i>	30 ^{cc}	—	—	12	—	—	3	—
<i>e</i>	30 ^{cc}	—	—	15	—	—	0	—

On les abandonne à un froid de — 5 degrés environ.

Au bout de 2 heures on les examine au microscope et on aperçoit déjà des aiguilles cristallines et quelques cristaux dans les mélanges *d* et *e*. Il n'y a encore rien dans *a*, *b*, *c*.

Après 5 jours de la même température, on voit de très nombreuses et très fines aiguilles dans *c*; dans *d* et *e* les aiguilles sont plus grosses, et les cristaux nombreux. Ainsi, au moins pour le sang de Chien, il est bon d'ajouter, pour avoir des cristaux d'oxyhémoglobine 1 vol. d'alcool éthylique à 95° pour 2 ou pour 3 vol. de globules laqués par 1 vol. d'eau distillée.

Expérience. — Du sang de Cheval défibriné par battage est centrifugé ; et les globules lavés à l'eau salée, sont laqués par leur vol. d'eau distillée. On fait alors agir sur cette solution d'oxyhémoglobine, l'Alcool éthylique ajouté peu à peu et dans la proportion de 1, 2, 3, 4, 5, vol. d'Alcool pour 10 vol. de globules laqués, et on a les mélanges :

<i>a</i>	40 ^{cc}	de globules laqués	+	4 ^{cc}	d'alcool éthylique	+	16 ^{cc}	d'eau
<i>b</i>	40 ^{cc}	—	—	8 ^{cc}	—	—	12 ^{cc}	—
<i>c</i>	40 ^{cc}	—	—	12 ^{cc}	—	—	8 ^{cc}	—
<i>d</i>	40 ^{cc}	—	—	16 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—
<i>e</i>	40 ^{cc}	—	—	20 ^{cc}	—	—	0 ^{cc}	—

On les laisse à un froid de — 8° ; et après 24 heures on les examine au microscope.

Il n'y a rien dans le mélange *a*. Dans *b* et *c*, il y a de nombreuses aiguilles; dans *d* ces aiguilles sont moins nombreuses, et on y aperçoit des cristaux et des dépôts amorphes. Enfin, le mélange *e* ne contient que des dépôts amorphes.

On prolonge encore pendant 5 jours, l'action de l'alcool à cette température, et on examine de nouveau.

Dans le mélange *a* il n'y a rien; dans *b* il y a de nombreuses aiguilles, dans *c* et *d* on aperçoit des cristaux nets, très longs, visibles à l'œil nu; dans *e*, les cristaux sont peu nombreux, et il y a en outre d'abondants dépôts amorphes.

On obtiendra donc des cristaux très nets d'oxyhémoglobine de Cheval, si on ajoute 1 vol. d'Alcool éthylique à 95° à 3 ou 4 vol. de globules laqués par leur vol. d'eau distillée. La cristallisation se produira encore si on emploie 1 vol. d'alcool pour 2 vol. de ces globules laqués; mais dans ce cas l'alcool agit trop rapidement sur la matière colorante et en précipite une partie à l'état de dépôts amorphes.

Expérience. — On a sectionné le cou d'un certain nombre de Poulets; et le sang, au sortir des carotides, est reçu dans une solution de fluorure de sodium à 1 % en quantité assez abondante pour en empêcher la coagulation. Les globules sont séparés par centrifugation, lavés à l'eau salée, et traités par l'Alcool éthylique dans les proportions de 2 et 3 vol. d'alcool pour 10 vol. de globules que l'on a laqués par 3 vol. d'eau distillée pour 1 vol. de globules.

On a les deux mélanges :

<i>a</i>	globules laqués	20 ^{cc}	+	4 ^{cc}	d'alcool éthylique
<i>b</i>	—	—	—	20 ^{cc}	+ 6 ^{cc} — —

Après 8 jours d'un froid de 0 à — 1°, il y a des aiguilles

nombreuses dans les deux mélanges, point de cristaux, ni de dépôts amorphes.

Après 12 jours, il y a des cristaux mal formés, peu nets, dont les arêtes sont déchiquetées, dans le mélange *a*. Ces cristaux sont plus rares dans *b* qui contient en outre des dépôts amorphes.

Après 20 jours, le mélange *a* contient outre ces cristaux qui ne sont pas encore très nets, quelques dépôts amorphes; dans *b* les cristaux sont plus petits et les dépôts beaucoup plus nombreux.

Nous avons vu qu'on pouvait obtenir des cristaux d'oxyhémoglobine de Chien en faisant agir 1 vol. d'alcool sur 2 vol. de globules laqués. Pour le Cheval la chose est déjà plus difficile, et la proportion de 1 vol. d'alcool pour 3 vol. de globules donnait de meilleurs résultats, avec le sang de Poulet la difficulté est plus grande et les expériences précédentes prouvent que l'emploi de 1 vol. d'alcool pour 5 vol. de globules serait préférable à tout autre.

Ces expériences suffisent pour établir que la quantité d'alcool qu'il convient d'ajouter aux globules laqués pour obtenir la meilleure cristallisation de l'oxyhémoglobine, varie suivant la nature du sang soumis à la précipitation. Elle varie vraisemblablement pour un même sang, suivant la richesse de la liqueur en oxyhémoglobine et aussi suivant la température ambiante.

Comme conclusion générale, on peut dire que les résultats les plus favorables sont obtenus par l'addition de la quantité d'alcool maxima qu'on peut employer sans déterminer de précipitation amorphe dans la liqueur oxyhémoglobinée.

L'emploi d'un excès d'alcool dans la préparation de l'oxyhémoglobine cristallisée est désavantageux, puisqu'il provoque la formation de dépôts amorphes qu'on

veut avant tout éviter. Si l'on se borne à ajouter la quantité d'alcool maxima précédemment indiquée, produisant la précipitation maxima de cristaux sans dépôts amorphes, on a une perte considérable d'oxyhémoglobine qui reste en solution dans la liqueur.

On s'est demandé, s'il ne serait pas possible de réduire cette perte, d'une façon plus ou moins notable. On a cherché, en particulier, à précipiter dans cette liqueur, débarrassée par filtration des cristaux d'oxyhémoglobine qu'on avait pu y produire, une nouvelle fraction d'oxyhémoglobine sous forme cristalline. A cet effet on a ajouté une nouvelle portion d'alcool, et on a abandonné le mélange au froid. Dans ces conditions et si faible que fût la quantité d'alcool ajoutée, on n'a jamais constaté la production de cristaux ni d'aiguilles, mais seulement la formation de dépôts amorphes.

Par conséquent, on n'aurait aucun avantage à essayer de préparer des cristaux d'oxyhémoglobine par précipitations successives, et pour ainsi dire fractionnées. Un excès d'alcool est toujours désavantageux, et cela pour deux raisons : d'abord, il provoque la production de dépôts amorphes ; ensuite il peut agir comme agent de décomposition de l'oxyhémoglobine.

Il existe donc pour chaque solution d'oxyhémoglobine une quantité d'alcool optima. C'est la quantité d'alcool la plus grande qu'on puisse ajouter sans déterminer la production de dépôts amorphes, soit immédiatement soit par un repos prolongé.

BIBLIOGRAPHIE

ARTHUS et HUBER. — *Procédé permettant d'obtenir des cristaux d'oxyhémoglobine* (C. R. Soc. de Biologie, 1893, p. 970).

ARTHUS. — *Procédé permettant d'obtenir facilement et rapidement des cristaux d'oxyhémoglobine* (C. R. Soc. de Biologie, 1895, p. 686).

STRUVE. — *Zur Kenntniss der Blutkrystalle und der Blutfarbstoffes* (Ber. d. deutsch. chem. Ges. XIV, p. 930, 1881).

HOPPE SEYLER. — *Loc cit.*

CHAPITRE III

Emploi de l'Alcool méthylique comme précipitant pour l'obtention des cristaux d'oxyhémoglobine.

* Hoppe-Seyler s'en était tenu à l'emploi exclusif de l'Alcool éthylique, dans la préparation de l'oxyhémoglobine cristallisée. La difficulté que j'avais éprouvée à obtenir ces cristaux avec le sang de Poulet, et surtout l'irrégularité de leurs formes, leur manque de netteté, m'ont conduit à rechercher s'il n'existait pas d'autres corps, permettant une cristallisation plus rapide et plus parfaite du pigment sanguin.

Parmi les substances qui précipitent l'oxyhémoglobine de ses solutions, j'en ai choisi une très voisine de l'Alcool éthylique par sa constitution chimique et ses propriétés : l'Alcool méthylique; et j'ai cherché quelle était son action sur la matière colorante des sangs de Poulet, de Cheval et de Chien.

Expérience. Du sang de Poulet est recueilli dans une solution à 1 % de fluorure de sodium, assez abondante pour en empêcher la coagulation. Les globules séparés par centrifugation du sérum et de la liqueur fluorée, lavés à trois reprises à l'eau salée à 1 %, sont laqués par 3 vol. d'eau distillée, pour 1 vol. de globules, puis traités par l'Alcool méthylique. On l'ajoute peu à peu, et en agitant chaque fois, et dans les proportions de 1 vol. d'alcool pour 3 vol. puis pour 5 vol. de globules laqués.

On a ainsi préparé les deux mélanges :

<i>a</i>	20 ^{cc}	de globules laqués	+	4 ^{cc}	d'alcool méthylique
<i>b</i>	20 ^{cc}	—	—	+	6 ^{cc} — — —

On les abandonne à la température de la glace fondante et on les examine au microscope. Au bout de 8 jours on trouve des cristaux bien formés à arêtes vives, très nombreux dans les deux tubes contenant ces mélanges.

Cette expérience montre bien que l'Alcool méthylique possède comme l'Alcool éthylique, la propriété de faire cristalliser l'oxyhémoglobine au moins celle du sang de Poulet.

Expérience. — On a défibriné du sang de Cheval, séparé les globules à la centrifuge, et lavé à trois reprises ces globules à l'eau salée à 1 %. On les laque alors par addition de traces d'éther et de 1 vol. d'eau distillée pour 1 vol. de globules.

Sur cette solution d'oxyhémoglobine j'ai fait agir l'Alcool méthylique, ajouté peu à peu, et dans les proportions de 1, 2, 3, 4 vol. d'alcool pour 10 vol. de globules laqués. J'ai ainsi les mélanges suivants :

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	4 ^{cc}	d'alcool méthylique
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	— — —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	— — —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	— — —

Je les abandonne pendant 5 jours à une température de + 5° environ ; et je les examine au microscope. Dans les mélanges *a* et *b* je trouve alors des aiguilles cristallines, fines longues, peu colorées, en assez grande quantité ; il n'y a point de cristaux à contours géométriques, mais quelques dépôts amorphes. Dans *c* et *d*, il n'y a rien.

Après 14 jours la température n'ayant pas sensiblement changé, les aiguilles ne sont pas plus nombreuses dans *a* et *b*, mais elles sont plus volumineuses et plus colorées, il n'y a point de cristaux, mais des

dépôts amorphes. Dans les mélanges *c* et *d* où les proportions d'Alcool méthylique sont très faibles, il n'y a ni cristaux ni aiguilles, ni dépôts.

Ainsi l'Alcool méthylique agissant à une température relativement élevée, sur l'oxyhémoglobine du Cheval en détermine la cristallisation.

Expérience. — J'ai soumis à l'action de l'Alcool méthylique des globules de sang de Chien, lavés à l'eau salée, puis laqués par 1 vol. d'eau distillée pour 1 vol. de globules. J'ai préparé de la sorte les cinq mélanges suivants dans lesquels les proportions d'alcool sont de 1, 2, 3, 4, 5 vol. pour 10 vol. de globules.

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'alcool méthylique		
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	—	
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—	—	
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—	—	
<i>e</i>	10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	

Malgré une température de -5° , je n'ai pu obtenir de cristaux dans aucun de ces mélanges. Je les ai examinés chaque jour, pendant trois semaines, au microscope. La température était sensiblement la même, mais je n'ai jamais aperçu ni cristaux ni aiguilles. Dans les mélanges *d* et *e*, il y avait des dépôts amorphes, rouge brique, granuleux, semblables à ceux que l'Alcool éthylique, employé en trop grande quantité, donne avec les solutions d'oxyhémoglobine.

L'Alcool méthylique n'a donc point une action uniforme sur les diverses oxyhémoglobines : très réelle sur les globules du sang de Poulet ; moins grande, mais très sensible encore, sur ceux de Cheval ; elle devient nulle au point de vue de la cristallisation, sur ceux de Chien, au moins dans les conditions où nous avons fait ces expériences.

CHAPITRE IV.

Emploi de l'Acétone ordinaire, comme précipitant, pour la cristallisation de l'oxyhémoglobine.

Deux substances de constitution à peu près semblable, les Acools méthylique et éthylique, se comportent donc d'une façon presque identique, vis-à-vis des solutions d'oxyhémoglobine. Doivent-ils cette propriété d'en permettre la cristallisation à leur constitution même ? Y a-t-il un rapport entre le phénomène de cristallisation et la composition de ces corps ?

Pour résoudre cette question, j'ai cherché à faire cristalliser le pigment sanguin, en employant un réactif de nature toute différente de celle de ces deux agents cristallisants. Je me suis adressé à un composé organique ne contenant plus la fonction alcool, mais la seule fonction cétonique : la Propanone ou Acétone ordinaire ; et je l'ai fait agir sur l'oxyhémoglobine des sangs de Chien, de Cheval et de Poulet.

Expérience. — Du sang de Chien est recueilli au sortir de l'artère fémorale, dans une solution d'oxalate d'ammoniaque à 1 %. Les globules sont séparés par centrifugation, lavés à trois reprises à l'eau salée à 1 %, et je les laque par addition de leur volume d'eau distillée.

Je les traite alors par des quantités croissantes d'Acétone ajoutée peu à peu, dans les proportions de 10 vol. de globules laqués, pour 1, 2, 3, 4, 5 vol. d'acétone.

Les mélanges suivants, ainsi préparés, sont soumis à un froid de -4 à -5 degrés environ.

a 10^{cc} de globules laqués + 1^{cc} d'acétone.

b 10^{cc} — — — 2^{cc} —

c 10^{cc} — — — 3^{cc} —

d 10^{cc} — — — 4^{cc} —

e 10^{cc} — — — 5^{cc} —

Après deux heures, j'en examine une goutte au microscope.

Dans les mélanges *a*, *b*, *c*, l'Acétone n'a produit encore aucune action. Dans *d* et *e*, on aperçoit déjà des aiguilles cristallines et des cristaux.

Après 24 heures, l'action de l'Acétone est encore nulle sur les mélanges *a* et *b*; dans le mélange *c*, il y a des aiguilles cristallines très fines, très nombreuses et assez longues; dans *d* les aiguilles sont plus grosses, et il y a aussi des cristaux; dans *e*, les aiguilles sont courtes, et les cristaux très bien formés.

Après cinq jours, les conditions de température restant à peu près les mêmes, l'Acétone n'a point agi dans dans le mélange *a*.

Il y a quelques aiguilles dans *b*; elles sont plus nombreuses, petites, fragmentées dans le mélange *c*; enfin les deux derniers *d* et *e* contiennent de très nombreuses fines aiguilles, un grand nombre de cristaux, et des dépôts amorphes.

Ainsi, avec le sang de Chien, l'Acétone ordinaire permet d'obtenir des cristaux d'oxyhémoglobine.

Expérience.— On a défibriné du sang de Cheval, puis séparé et lavé les globules. On le laque par addition de 1 vol. d'eau distillée, pour 1 vol. de globules; et on traite cette solution par l'Acétone, que l'on ajoute peu à peu dans les proportions de 1, 2, 3, 4, 5 vol. d'Acétone pour 10 vol. de globules laqués.

Je prépare ainsi les solutions suivantes :

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+ 1 ^{cc}	d'acétone.
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc} —
<i>c</i>	20 ^{cc}	—	—	3 ^{cc} —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	4 ^{cc} —
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc} —

Soumis à une température de — 5° environ, et examinés au microscope au bout de vingt-quatre heures, les mélanges *a*, *b*, *c*, ne contiennent ni formes cristallines, ni dépôts; dans *d* et *f*, il y a quelques cristaux, mais ils sont très instables, et au contact de l'air, ils se désagrègent, formant des dépôts amorphes.

Après cinq jours, les trois mélanges *a*, *b*, *c*, ne contiennent encore rien : dans *d*, il y a quelques cristaux très nets et qui résistent assez longtemps à l'action de de l'air; dans *f*, ces cristaux sont très nombreux, et ils sont entourés de nombreux dépôts.

Sur le sang du Cheval, l'action de l'Acétone est donc encore très certaine; mais elle est cependant moins sensible que sur le sang du Chien.

Expérience. — On a recueilli du sang de Poulet dans une solution de fluorure de sodium à 1 %. Les globules sont séparés par centrifugation, lavés à l'eau salée, et laqués par addition de 3 vol. d'eau distillée, pour 1 vol. de globules.

A cette solution d'oxyhémoglobine, j'ajoute peu à peu de l'Acétone, en ayant le soin d'agiter chaque fois, et dans les proportions de 10 vol. de globules laqués pour 0,5, 1, 2, 3 vol. d'Acétone. Je prépare donc les mélanges :

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	0 ^{cc} 5	d'acétone.
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc} —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc} —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc} —

Ces mélanges, soumis à une température qui ne dé-

pas 0°, sont examinés au microscope. Au bout de huit jours, ils contiennent tous des dépôts amorphes, mais point de formes cristallines. La température s'abaisse alors jusqu'à —6°. Après douze jours d'exposition à cette nouvelle température, un second examen microscopique ne décèle pas la moindre trace, soit de cristaux, soit d'aiguilles cristallines : il y a exclusivement des dépôts amorphes dans chacun de ces mélanges.

Employé, soit en quantité très petite, — le mélange *a* contenait seulement 1/20 d'Acétone, — soit en quantité beaucoup plus grande — dans *d*, il y a 1 vol. d'Acétone pour 3 vol. de globules laqués c'est à dire parties égales d'Acétone et de globules, ce réactif, au moins dans les conditions de l'expérience, ne permet pas d'obtenir sous forme cristallisée, l'oxyhémoglobine du Poulet.

L'Acétone n'en est pas moins, et d'une façon indiscutable, un agent capable, dans certains cas, de produire la cristallisation de la matière colorante du sang, comme le font les Alcools éthylique et méthylique.

Comment cette action a-t-elle lieu ? Y a-t-il une relation entre l'oxyhémoglobine cristallisée et l'Acétone aidant à cette cristallisation ? C'est peu vraisemblable, car l'effet produit est le même, quoique les deux causes : Alcools primaires d'une part, et Acétone d'autre part, soient très différentes.

Quoiqu'il en soit, ces expériences démontrent que l'on peut se servir de l'Acétone ordinaire, pour faire cristalliser l'oxyhémoglobine, du moins, celle du Chien et du Cheval.

CHAPITRE V.

Action comparée des Alcools éthylique et méthylique et de l'Acétone, employés comme agents précipitants, dans la préparation des cristaux d'oxyhémoglobine.

L'Alcool méthylique, l'Alcool éthylique et l'Acétone ordinaire, permettent d'obtenir le pigment sanguin à l'état cristallisé. Mais dans ce phénomène de cristallisation, ils n'ont point une action absolument identique. On a vu l'Acétone réagir sans aucun résultat autre qu'une précipitation, sur l'oxyhémoglobine du Poulet, tandis que l'Alcool méthylique en produisait facilement la cristallisation. De même, cet Alcool méthylique était sans influence sur le sang du Chien ; alors que même à une température relativement élevée : $+ 4^{\circ}$, il donnait avec les globules du Cheval, des aiguilles cristallines. On ne peut donc employer indifféremment, un quelconque de ces trois corps ; il y a parmi eux un choix à faire. J'ai recherché les avantages que présentait leur emploi et j'ai étudié de quelle façon chacun d'eux se comportait, vis-à-vis du sang d'un même animal, dans les mêmes conditions de température et de dilution ; quel était en un mot le meilleur réactif.

Pour cela, j'ai fait agir ces trois corps sur les globules laqués du Poulet, du Cheval et du Chien.

Expérience. — Du sang de Chien, au sortir de l'artère fémorale, est défibriné : les globules en sont lavés à l'eau

salée, puis laqués par 1 vol. d'eau distillée pour 1 vol. de globules; j'obtiens ainsi 150^{cc} de solution d'oxyhémoglobine. Je fais trois parts de cette liqueur qui me donneront les trois séries A, B, C. Elles seront traitées : la série A, par des quantités croissantes d'Alcool éthylique; les séries B et C, par les mêmes quantités d'Alcool méthylique et d'Acétone. Sur 10 vol. de globules laqués, je fais agir 1, 2, 3, 4, 5 vol. de réactif, et je prépare les mélanges suivants :

SÉRIE A (Action de l'alcool éthylique).

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'alcool éthylique	+	4 ^{cc}	d'eau.
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	0 ^{cc}	—

SÉRIE B (Action de l'alcool méthylique).

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'alcool méthylique	+	4 ^{cc}	d'eau
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	—	3	—
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—	—	2	—
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—	—	1	—
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	0	—

SÉRIE C (Action de l'acétone).

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'acétone	+	4 ^{cc}	d'eau.
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	0 ^{cc}	—

Ces expériences sont faites à une température de — 5° environ. J'examine ces mélanges au microscope deux heures après les avoir préparés : l'Acétone et l'Alcool éthylique ont déjà produit une cristallisation. Dans les séries A et C, les mélanges *d* et *f* contiennent des aiguilles cristallines et quelques cristaux. Dans la série B, il n'y a encore rien.

Après vingt-quatre heures, l'action de l'Alcool méthylique est encore nulle ; celle de l'Acétone et de l'Alcool éthylique est devenue plus active. Dans la série A, le nombre et les dimensions des aiguilles et des cristaux ont augmenté dans les mélanges *d* et *f* ; il n'y a rien dans les mélanges *a*, *b*, *c*, de cette même série. Dans la série C, les mélanges *a* et *b* ne contiennent encore rien, mais il y a de nombreuses aiguilles dans *c* ; dans *d* et *f*, les aiguilles sont plus grosses, plus nombreuses, les cristaux plus volumineux qu'ils ne l'étaient la veille.

Après cinq jours, la température ne variant pas sensiblement, la série B ne présente aucune forme cristalline. Dans la série A, le mélange *c* contient des aiguilles très fines, le mélange *d* et *f*, des aiguilles et de nombreux cristaux. Dans la série C, le mélange *a*, seul, ne renferme pas d'aiguilles cristallines : il y en a, en effet, dans *b*, *c*, *d* et *f* ; dans les deux derniers, *d* et *f*, il y a en outre des cristaux très nombreux, mais ils ne sont pas aussi bien formés qu'ils l'étaient quatre jours auparavant, et ils sont entourés de nombreux dépôts.

Cette expérience prouve que, du moins, dans les proportions employées, l'Alcool méthylique ne fait pas cristalliser l'oxyhémoglobine du Chien. Quant à l'Actone, son action est plus rapide que celle de l'Alcool éthylique. Après 24 heures, le mélange *c* de la série C, contient de nombreuses aiguilles cristallines, tandis que dans le même mélange de la série A, on n'en trouve que cinq jours plus tard. De même, le mélange *b* de la série C, contient des aiguilles, alors que le même mélange *b*, de la série A n'en contient point.

Ce n'est pas à dire pour cela que l'emploi de l'Acétone soit recommandé à l'exclusion de l'Alcool éthylique. Son activité même serait un désavantage, puisqu'à la longue, après cinq jours, les cristaux qu'elle a formés ont ten-

dance à se désagréger, à se décomposer pour former des dépôts amorphes. comme on l'a vu dans les mélanges *d* et *f* de la série C.

Expérience. — On a reçu du sang de Poulet au sortir des carotides dans une solution d'oxalate d'ammoniaque à 1 % et on a vivement agité pour éviter la coagulation. On a séparé les globules, on les lave à l'eau salée, et on les laque par 3 fois leur volume d'eau distillée. On en fait 3 parts, et sur chacune d'elles on fait agir les 3 réactifs.

On a ainsi préparé les 3 séries A, B, C avec les mélanges suivants :

SÉRIE A (Éthanol).

<i>a</i> : globules laqués...	10 ^{cc}	+	1 ^{cc}	d'alcool éthylique	
<i>b</i>	—		10 ^{cc}	2 ^{cc}	—
<i>c</i>	—		10 ^{cc}	3 ^{cc}	—

SÉRIE B (Méthanol).

<i>a</i> : globules laqués...	10 ^{cc}	+	1 ^{cc}	d'alcool méthylique	
<i>b</i>	—		10 ^{cc}	1 ^{cc}	—
<i>c</i>	—		10 ^{cc}	3 ^{cc}	—

SÉRIE C (Propanone).

<i>a</i> : globules laqués...	10 ^{cc}	+	1 ^{cc}	d'acétone	
<i>b</i>	—		10 ^{cc}	2 ^{cc}	—
<i>c</i>	—		10 ^{cc}	3 ^{cc}	—

Ces expériences ont lieu à une température inférieure à — 5°. Après 3 jours on examine chacun de ces mélanges au microscope et on ne voit aucune trace de forme cristalline dans aucun d'eux. Les mélanges de la série C contiennent de nombreux dépôts informes ; ces dépôts sont beaucoup moins abondants dans les 2 séries A et B.

Après 8 jours, la série C ne contient que des dépôts. Dans la série A, le mélange *a* ne contient que quelques

dépôts ; dans les mélanges *b* et *c*, il y a des aiguilles cristallines. Dans la série B, le mélange *a* ne renferme que de rares dépôts ; il y a au contraire dans *b* et *c* des cristaux très nets, parfaitement formés.

Après 12 jours, l'Acétone n'a produit encore aucune action : on ne voit que des dépôts dans la série C.

Dans la série A, le mélange *a* ne renferme que de rares dépôts ; le mélange *b*, outre ces dépôts, contient de nombreux cristaux, mais dont les formes sont très vagues, très irrégulières ; dans le mélange *c*, les cristaux sont beaucoup moins nombreux, et le nombre des dépôts est plus grand.

Dans la série B, le mélange *a* n'a point de cristaux ; au contraire, dans *b* et *c* il y a un très grand nombre de cristaux et qui sont très bien formés.

Après 20 jours, l'action de l'Acétone reste nulle : il y a des dépôts amorphes dans la série C, et rien de plus. Les cristaux de la série A sont rares et mal formés ; ceux de la série B sont nombreux et présentent des formes géométriques très nettes.

Il résulte de cette expérience que l'emploi de l'Alcool méthylique est préférable à celui de l'Alcool éthylique pour obtenir sous forme cristallisée l'oxyhémoglobine du Poulet. Quant à l'Acétone, les mauvais résultats qu'elle a fournis semblent devoir en condamner l'usage.

Expérience. — On a défibriné du sang de Cheval et lavé les globules à l'eau salée ; on laque par 1 volume d'eau distillée pour 1 volume de globules. La solution ainsi obtenue est alors soumise à l'action de l'Alcool éthylique et de l'Acétone dans les proportions de 1, 2, 3, 4 5 volumes de chacun d'eux pour 10 volumes de globules laqués.

J'obtiens ainsi les 2 séries A et B formées des mélanges suivants :

SÉRIE A (Éthanol).

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'alcool	+	4 ^{cc}	d'eau.
<i>b</i>	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—
<i>c</i>	10 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—
<i>d</i>	10 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—		1 ^{cc}	—
<i>f</i>	10 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		0 ^c	—

SÉRIE B (Propanone).

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	d'acétone	+	4 ^{cc}	d'eau
<i>b</i>	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—
<i>c</i>	10 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—
<i>d</i>	10 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—		1 ^{cc}	—
<i>f</i>	10 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		0 ^c	—

Ces expériences sont faites à un froid de — 8°.

J'examine ces mélanges après 24 heures et je trouve des cristaux dans les 2 séries. Dans la série A, le mélange *a* ne contient rien ; dans *b* et *c* il y a de nombreuses aiguilles ; dans *d* il y a des aiguilles, des cristaux et des dépôts amorphes ; dans *f* il y a seulement des dépôts.

Dans la série B, les mélanges *a*, *b*, *c* ne contiennent rien ; dans *d* et *f* il y a quelques cristaux, très instables, et de nombreux dépôts.

Après 5 jours, le mélange *a* de la série A ne contient ni aiguilles, ni cristaux, ni dépôts : l'action de l'alcool éthylique est nulle. Dans *b* il y a de nombreuses aiguilles ; dans *c* et *d* les cristaux sont nombreux ; dans *f* leur nombre est encore plus grand et il y a en plus des dépôts.

Dans la série B, les mélanges *a*, *b*, *c* ne donnent aucun résultat ; dans *d* il y a quelques cristaux ; dans *f* ils sont très nombreux et très bien formés, et, comme dans *f* de la série A, ils sont entourés d'abondants dépôts.

Ainsi, employée dans les proportions de 2, 3 volumes

pour 10 volumes de globules laqués, l'Acétone n'amène pas de cristallisation, alors que l'Alcool éthylique, agissant sur la même solution de globules, et dans les mêmes conditions de température et de dilution, produit cette cristallisation. De plus, les cristaux sont plus nombreux et les dépôts amorphes moins abondants, si l'on s'est servi de l'Alcool et non de l'Acétone.

L'Alcool éthylique est donc préférable à l'Acétone ordinaire pour faire cristalliser l'oxyhémoglobine du Cheval, si on veut opérer à basse température.

Expérience. — On a défibriné du sang de Cheval, et les globules, séparés par centrifugation, sont lavés à l'eau salée, puis laqués par 1 volume d'eau distillée pour 1 volume de globules. On les traite alors par les Alcools éthylique et méthylique, puis par l'Acétone, et dans les mêmes conditions de température et de dilution.

Je prépare ainsi les trois séries A, B, C, avec les mélanges suivants :

SÉRIE A (Éthanol)

a	10 ^{cc} de globules laqués	+ 4 ^{cc} d'alcool éthylique	+ 2 ^{cc} d'eau.
b	10 ^{cc} —	3 ^{cc} —	3 ^{cc} —
c	10 ^{cc} —	2 ^{cc} —	4 ^{cc} —
d	10 ^{cc} —	1 ^{cc} —	5 ^{cc} —

SÉRIE B (Méthanol).

a	10 ^{cc} de globules laqués	+ 4 ^{cc} d'alcool méthylique	+ 2 ^{cc} d'eau.
b	10 ^{cc} —	3 ^{cc} —	3 ^{cc} —
c	10 ^{cc} —	2 ^{cc} —	4 ^{cc} —
d	10 ^{cc} —	1 ^{cc} —	5 ^{cc} —

SÉRIE C (Propanome).

a	10 ^{cc} de globules laqués	+ 4 ^{cc} d'acétone	+ 2 ^{cc} d'eau.
b	10 ^{cc} —	3 ^{cc} —	3 ^{cc} —
c	10 ^{cc} —	2 ^{cc} —	4 ^{cc} —
d	10 ^{cc} —	1 ^{cc} —	5 ^{cc} —

Ces expériences sont faites à une température de $+5^{\circ}$: nous sommes donc dans des conditions toutes différentes de celles où nous étions précédemment.

Les mélanges sont examinés au microscope après 24 heures. On ne trouve alors absolument rien dans aucune des séries. Après huit jours, l'Alcool éthylique et l'Acétone n'ont produit aucun résultat. Au contraire, dans la série B, il y a de longues et rares aiguilles cristallines dans les mélanges *a* et *b*, mais rien dans *c* ni *d*.

Après 20 jours, l'Acétone et l'Alcool éthylique n'ont encore rien donné. Les aiguilles obtenues dans les mélanges *a* et *b* de la série B ne sont ni plus abondantes ni plus volumineuses, leur teinte seule s'est modifiée. D'abord presque incolores, elles sont devenues plus foncées et présentent l'aspect de celles obtenues dans les expériences précédentes, où l'Alcool éthylique agissait en petite quantité et à basse température sur l'oxyhémoglobine du Cheval.

Sans doute, les formes cristallines, ainsi obtenues, ne sont point absolument parfaites, et il serait très difficile d'en déterminer rigoureusement les arêtes, les angles, les facettes, mais ces aiguilles n'en ont pas moins une structure très nettement cristalline et on ne peut pas les considérer comme substances amorphes. On est donc en droit de dire qu'à température élevée, l'Alcool méthylique permet la cristallisation de l'oxyhémoglobine du Cheval, et que l'Acétone et l'Alcool éthylique n'ont point cette propriété.

Il est bien vraisemblable que cette supériorité de l'Alcool méthylique se serait accusée d'une façon bien plus sensible si j'avais pu opérer à basse température.

La chose ne m'ayant pas été possible, je puis tirer de ces expériences les deux seules conclusions suivantes :

1^o A haute température : $+5^{\circ}$, l'Alcool méthylique

laisse cristalliser l'oxyhémoglobine du Cheval : dans ces conditions, l'action de l'Acétone et de l'Alcool éthylique est nulle ;

2° A basse température, la cristallisation est facile avec ces deux derniers corps, mais l'Alcool éthylique donne de meilleurs résultats que l'Acétone.

En résumé: à l'Alcool éthylique exclusivement employé jusqu'à aujourd'hui, on peut substituer, dans plusieurs cas, deux autres réactifs: l'Alcool méthylique et l'Acétone ordinaire.

Pour le sang du Poulet, en particulier, cette substitution sera très heureuse, et les cristaux seront plus nombreux et beaucoup plus nets si on s'est servi de l'Alcool méthylique.

CHAPITRE VI.

Action de certaines solutions salines diluées sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine.

(Sels alcalins et alcalino-terreux.)

Hoppe-Seyler (1) attribuait au froid un rôle très actif dans la préparation de l'oxyhémoglobine cristallisée. Avant d'ajouter l'alcool à la solution des globules, il avait le soin de les refroidir à 0°. Il ne nous a point paru nécessaire de prendre cette précaution ; et dans toutes nos expériences nous avons versé, sans les faire refroidir les réactifs sur les globules laqués. Il est indiscutable cependant que la température est un facteur très important de cette cristallisation. Alors qu'à une température de + 4° l'Alcool éthylique et l'Acétone ne nous donnent point de cristaux, avec les globules laqués du sang de Cheval, nous les voyons se former très rapidement dès que la température est abaissée. Mais n'existe-t-il pas de substances favorisant cette cristallisation et permettant d'obtenir, sans le secours de températures très basses, le pigment sanguin à l'état cristallisé ? J'ai recherché si, parmi les corps qui ne décomposent pas l'oxyhémoglobine, il n'y en avait point présentant cet avantage, et j'ai étudié qu'elle était l'action des sels neutres alcalins et alcalino-terreux que j'ai fait agir en quantités variables sur la solution de globules avant de la traiter par l'alcool.

Hoppe-Seyler, *loc. cit.*

Expérience. — Des globules lavés de sang de Cheval sont laqués par 1 volume d'eau distillée pour un volume de globules. On a préparé d'autre part des solutions diluées à 1 % de chlorhydrate d'ammoniaque, de chlorures de potassium, de sodium, de calcium, de magnésium, et on les fait agir sur la solution de globules dans les proportions de 1, 2, 3, 4, 5 volumes pour 10 de globules laqués. On ajoute alors l'Alcool éthylique dans la proportion de 1 volume pour 4 volumes du mélange, et on prépare ainsi les séries A, B, C, D, E, formées des mélanges *a*, *b*, *c*, *d*, *f*, contenant 0 gr. 05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 de chacun des sels précédents : les mélanges *f* ne contiennent pas de sel et serviront de témoin.

SÉRIE A (Az H¹ Cl)

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués	+	1 ^{cc} de Az H ¹ Cl	+	4 ^{cc} alcool éthyl.	+	4 ^{cc} d'eau
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	3 ^{cc}
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	2 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	1 ^{cc}
<i>e</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	0 ^{cc}
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	5 ^{cc}

SÉRIE B (K Cl)

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués	+	1 ^{cc} de Kcl	+	4 ^{cc} d'alcool	+	4 ^{cc} d'eau
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	3 ^{cc}
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	2 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	1 ^{cc}
<i>e</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	0 ^{cc}
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	5 ^{cc}

SÉRIE C (Na Cl)

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués	+	1 ^{cc} de Nacl	+	4 ^{cc} d'alcool	+	4 ^{cc} d'eau
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	3 ^{cc}
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	2 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	1 ^{cc}
<i>e</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	0 ^{cc}
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	5 ^{cc}

SÉRIE D (Ca Cl²)

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 1 ^{cc} de Ca Cl ² + 4 ^{cc} d'alcool + 4 ^{cc} d'eau					
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 3 ^{cc}
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 2 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 1 ^{cc}
<i>e</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 0 ^{cc}
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 5 ^{cc}

SÉRIE E (Mg Cl²)

<i>a</i> 10 ^{cc} de globule laqués + 1 ^{cc} de Mg Cl ² + 4 ^{cc} d'alcool + 4 ^{cc} d'eau					
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 3 ^{cc}
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 2 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 1 ^{cc}
<i>e</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 0 ^{cc}
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 5 ^{cc}

Les tubes, dans lesquels sont préparées ces expériences, sont placés à la température de la glace fondante. Après 14 heures, j'ai trouvé des cristaux parfaitement nets dans le mélange *a* de la série D : à ce moment, il n'y a aucune forme cristalline, pas de dépôts dans aucun des autres tubes.

Après 24 heures, l'action du Chlorure de Calcium et aussi celle du Chlorure de Magnésium sont très sensibles : il y a en effet des cristaux dans chacun des tubes des séries E et D, sauf dans les mélanges qui ne contiennent pas de sel. Ces cristaux sont surtout abondants dans les tubes *a* et *b*.

Les Chlorures d'Ammonium, de Potassium, de Sodium n'ont encore donné aucun résultat. Après 48 heures les cristaux sont très parfaits, bien visibles à l'œil nu, et très nombreux dans *a* et *b* des séries E, D ; dans les mélanges *c*, *d*, *e*, les cristaux sont moins nombreux mais plus longs, plusieurs d'entre eux ont de 1^{cm} à 1^{cm}, 5, et ils sont enveloppés de dépôts abondants. Les mélanges *f* de ces mêmes séries ne contiennent rien : on ne trouve rien non plus dans les séries A B C.

Ainsi les Chlorures de Magnésium et de Calcium ont une influence très manifeste sur la cristallisation du pigment sanguin. Déjà après 14 heures, la présence de traces de Chlorure de Calcium a suffi pour provoquer cette cristallisation. Après un contact plus long de 24 et de 48 heures, tous les mélanges contenant une certaine quantité de ces deux sels, et ceux-là seuls, renferment des cristaux ; comme ils sont d'autant plus volumineux que la quantité de sel est plus grande, j'ai cherché à développer encore leurs dimensions par l'emploi de quantités plus grandes de sels.

Expériences. — Des globules lavés de Cheval sont laqués par un volume d'eau distillée ; et on y ajoute une solution de Chlorure de Calcium à 1 % en proportion, telle qu'ils contiennent 0 gr. 06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10 de CaCl^2 pour 10^{cc} de globules laqués. On a ainsi préparé les mélanges suivants :

<i>a</i>	globules laqués :	10 ^{cc}	+	CaCl^2	10 ^{cc}	+	alcool	6 ^{cc}	+	Eau :	0 ^{cc}
<i>b</i>	—	10 ^{cc}	—	9 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	1 ^{cc}			
<i>c</i>	—	10 ^{cc}	—	8 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	2 ^{cc}			
<i>d</i>	—	10 ^{cc}	—	7 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	3 ^{cc}			
<i>e</i>	—	10 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	4 ^{cc}			
<i>f</i>	—	10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	6 ^{cc}	—	10 ^{cc}			

L'alcool est toujours employé dans la proportion de 1 volume pour 4 volumes du mélange. Le mélange *f* sert de témoin.

Après 8 jours, ces mélanges ne contiennent point de cristaux.

Ce résultat pouvant tenir à une trop grande dilution, j'ai préparé une solution de CaCl^2 , à un pour dix, qui me permet, sans augmenter cette dilution de faire agir des quantités plus grandes de sel, telles que, 0 gr. 5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1. J'ai pour cela préparé les mélanges suivants,

dans lesquels l'alcool agit toujours dans les mêmes proportions : 1 vol. pour 4 vol. du mélange,

$\bullet$							
a	10 ^{cc}	de globules	+	5 ^{cc}	de CaCl ²	+	0 ^{cc} d'eau + 4 ^{cc} d'alcool
b	10 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—	1 ^{cc}	— 4 ^{cc} —
c	80 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—	2 ^{cc}	— 4 ^{cc} —
d	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	— 4 ^{cc} —
e	10 ^{cc}	—		1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	— 4 ^{cc} —
f	10 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—	5 ^{cc}	— 4 ^{cc} —

La température est celle de la glace fondante comme dans le cas précédent. Après 24 heures, il y a des dépôts dans tous les tubes où sont contenus ces mélanges, mais pas de cristaux

Après huit jours, il n'y a encore que des dépôts. Le CaCl² ne paraît donc point agir comme simple agent de contact, mais il semble plutôt qu'il se comporte d'une manière analogue à celle de l'alcool. A doses faibles il provoque une précipitation lente de la matière colorante, suivie d'une cristallisation parfaite. Si on l'emploie à doses plus élevées, la précipitation est plus rapide, plus complète; et les cristaux, de moins en moins nombreux si la proportion de CaCl² augmente encore, sont bientôt remplacés par des dépôts amorphes.

Cette action heureuse du Chlorure de Calcium se fait encore sentir si au lieu de l'Alcool éthylique on se sert de l'Alcool méthylique. On a vu qu'avec ce corps, l'oxy-hémoglobine cristallise seulement, sous forme d'aiguilles, si la température n'est pas inférieure à 0°. A cette même température cependant, on peut avoir des cristaux très nets si on fait intervenir le CaCl².

Expérience. — On a laqué des globules de sang de Cheval par addition de leur volume d'eau distillée. On ajoute une solution de CaCl² à 1 % dans les proportions de 1, 2, 5^{cc} pour 10^{cc} de globules laqués; puis on traite

par l'Alcool méthylique dans la proportion de 1^{cc} d'alcool pour 4^{cc} du mélange. On a ainsi les mélanges ;

<i>a</i>	10 ^{cc} de globules laqués	+ 1 ^{cc} de CaCl ²	+ 4 ^{cc} d'eau	+ 4 ^{cc} de méthanol	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc} — 4 ^{cc} —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	0 ^{cc} — 4 ^{cc} —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	0 ^{cc}	—	5 ^{cc} — 4 ^{cc} —

Le mélange *d* sert de témoin.

On les examine au microscope après les avoir laissés 24 heures à la température de la glace fondante, et on n'y trouve point de cristaux. Après 48 heures, il y en a quelques uns dans *a*, *b*, *c*. Après 10 jours, les cristaux sont nombreux, très bien formés. Dans les mélanges *d*, il n'y a que des aiguilles cristallines très fines.

Les mêmes essais ont été repris avec l'Acétone, mais ils n'ont donné aucun résultat.

REMARQUE. — Cette action favorissante des sels alcalino terreux sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine est intéressante à signaler. Elle doit être rapprochée de l'action favorisante exercée par les mêmes sels (à un degré beaucoup plus élevé que par les sels d'alcalis), sur les précipitations et coagulations des substances protéiques.

CHAPITRE VII

Cristallisation de l'Hémoglobine.

L'oxyhémoglobine n'est point la seule matière colorante du sang qui en contient une autre, l'hémoglobine. Ces deux substances ont entre elles beaucoup d'analogie, elles ne diffèrent l'une de l'autre que par la présence ou l'absence d'oxygène : l'oxyhémoglobine donnant par réduction l'hémoglobine ; tandis que l'hémoglobine oxydée devient l'oxyhémoglobine.

La similitude relativement grande de constitution et de propriétés de ces deux corps m'a conduit à chercher s'il n'était pas possible d'appliquer avec succès les procédés de cristallisation de l'oxyhémoglobine à l'hémoglobine.

Expérience. — On a centrifugé du sang de Poulet, et les globules obtenus sont lavés à l'eau salée, puis abandonnés pendant 8 jours à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, et sous l'action des fermentations qui s'y sont développées, la masse a changé complètement d'aspect. Elle possède une forte odeur de putréfaction ; sa coloration est d'un rouge foncé et sa consistance est telle qu'on peut retourner l'éprouvette qui contient ces globules sans les faire tomber. J'ajoute à ce magma 3 fois son vol. d'eau distillée ; j'agite vigoureusement et j'ai ainsi une solution d'hémoglobine.

Je la traite alors par les trois réactifs ordinaires dans la proportion de 1 vol. de chacun d'eux pour 20, 10, 7,5 vol.

de solution. Je prépare ainsi les 3 séries A. B. C. formées des mélanges suivants :

SÉRIE A (Ethanol)

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globule laqués + 0,5 d'alcool éthylique	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	1 ^{cc} —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	1,5 —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	2 ^{cc} —

SÉRIE B (Méthanol)

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules + 0,5 d'alcool méthylique	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	1 ^{cc} —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	1,5 —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	2 ^{cc} —

SÉRIE C (Acétone)

<i>a</i>	10 ^{cc}	de globules + 0,5 d'acétone	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	1 ^{cc} —
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	1,5 —
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	2 ^{cc} —

Ces mélanges sont exposés pendant 3 jours à la température de la glace fondante. Je les examine alors au microscope, mais sans trouver dans aucun d'eux la moindre trace de cristallisation : tous au contraire renferment des dépôts amorphes.

Après 8 jours, la température s'étant abaissée à — 5°, je les examine de nouveau. Les mélanges *a. b. c.* de la série A. ne contiennent que des dépôts ; le mélange *d.* contient lui aussi des dépôts, mais il y a en outre quelques cristaux ; ils n'ont pas tous, d'ailleurs des formes absolument nettes beaucoup ont leurs angles émoussés, rongés en quelque sorte, ce qui leur donne l'aspect de globules elliptiques. Les mélanges *a. b. c.* de la série B renferment seulement des dépôts ; au contraire, dans le mélange *d* il y a en outre les dépôts un assez grand nombre de cristaux très bien formés, à contours géométriques, très nets. Enfin les mélanges de la série C ne contiennent que des dépôts.

Nous étions arrivés à des résultats très semblables, lorsque nous avons fait agir ces 3 précipitants sur une solution d'oxyhémoglobine.

L'Acétone ne nous donnait qu'une précipitation amorphe, jamais de cristaux ; l'Alcool éthylique permettait déjà d'arriver à une certaine cristallisation ; mais le réactif de choix était l'Alcool méthylique. Vis-à-vis de l'hémoglobine ces 3 corps se sont comportés d'une façon tout à fait analogue. A 0°, il y avait seulement production de dépôts, quel que fût le réactif employé ; à une température plus basse, l'Alcool éthylique permettait d'obtenir des cristaux dont le nombre était plus grand et les formes beaucoup mieux accusées si on se servait de l'Alcool méthylique. Quant à l'Acétone, son action restait la même : on n'obtenait avec elle que la précipitation sous formes de dépôts amorphes, de la matière colorante.

Et les cristaux que nous avons ainsi obtenus ne sont pas de l'oxyhémoglobine, mais bien de l'hémoglobine ; ils n'ont ni la couleur, ni la forme de ceux d'oxyhémoglobine. Ils se dissolvent très rapidement à l'air, donnant à la solution une couleur rouge vif par suite de leur transformation en oxyhémoglobine sous l'action de l'oxygène de l'air. De plus, examinés au microspectroscope, ils ne présentent pas les 2 raies d'absorption de l'oxyhémoglobine, mais la seule raie de l'hémoglobine.

Les avantages que présente l'emploi des solutions diluées des Chlorures de Calcium et de Magnésium pour préparer les cristaux d'oxyhémoglobine existent aussi pour l'hémoglobine.

A la température de la glace fondante, nous avons pu obtenir en grande quantité des cristaux très bien formés d'hémoglobine, grâce à la présence de sels alcalino-terreux.

Expérience. — On a préparé des solutions à 1 % de Ca Cl^2 Ba Cl^2 Sr Cl^2 . D'autre part, on a centrifugé du sang défibriné de cheval, et les globules lavés à l'eau salée sont abandonnés à la température du laboratoire pendant 8 jours. Ils présentent alors une odeur de putréfaction très avancée, et leur coloration est devenue rouge foncé. Je les laque par addition de 1 vol. d'eau distillée pour 3 vol. de globules, ce qui me donne une solution relativement concentrée d'hémoglobine sur laquelle je fais agir les solutions salines précédentes dans les proportions de 1, 2, 5 vol. pour 10 vol. de globules laqués. Chacun des mélanges ainsi préparé sera alors traité par le quart de son vol. d'Alcool éthylique, d'Alcool méthylique et d'Acétone.

Pour rendre bien manifeste l'action de ces solutions salines, on fera agir ces 3 précipitants sur une solution d'hémoglobine qui ne contiendra pas trace de sels.

On a donc les séries A, B, C, formées des mélanges suivants :

SÉRIE A (Ca Cl^2)

a	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	de Ca Cl^2	+	4 ^{cc}	d'eau	+	4 ^{cc}	d'alcool
b	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
c	10 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
d	10 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—

SÉRIE B (Ba Cl^2)

a	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	de Ba Cl^2	+	4 ^{cc}	d'eau	+	4 ^{cc}	d'alcool
b	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
c	10 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
d	10 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—

SÉRIE C (Sr Cl^2)

a	10 ^{cc}	de globules laqués	+	1 ^{cc}	de Sr Cl^2	+	4 ^{cc}	d'eau	+	4 ^{cc}	d'alcool
b	10 ^{cc}	—		2 ^{cc}	—		3 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
c	10 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—
d	10 ^{cc}	—		0 ^{cc}	—		5 ^{cc}	—		4 ^{cc}	—

On aura les séries A', B', C' et A'', B'', C'' en remplaçant

dans les séries précédentes, l'Alcool éthylique par l'Alcool méthylique et par l'Acétone.

Les tubes dans lesquels sont faites ces expériences sont abandonnés à la température de la glace fondante. On les examine au microscope après 24 heures; et on trouve des cristaux d'hémoglobine dans chacun des mélanges *c* des séries A, B, C. Ils y sont peu nombreux et entourés de nombreux dépôts.

Après 48 heures, il y a des cristaux dans chacun des mélanges salés des séries A, B, C. Ils sont peu nombreux dans les mélanges *a*; plus nombreux et plus volumineux dans *b*; très gros, mais moins nombreux dans le mélange *c* qui contient d'abondants dépôts amorphes. Il n'y a absolument que des dépôts dans chacun des mélanges *d*.

Le nombre et les dimensions des cristaux ne sont pas absolument les mêmes, dans chacune des séries. Il semble que le Chlorure de Baryum ait une action plus heureuse que les deux autres. Les cristaux trouvés dans le mélange *b* de la série B sont très volumineux et ont au moins un centimètre carré de surface, et leur épaisseur atteint près de un millimètre. Ceux de la série C sont, au contraire, extrêmement minces et très peu colorés; mais ils le sont assez cependant pour qu'on puisse distinguer très nettement leur couleur violacée toute différente de la couleur rouge pourpre des cristaux d'oxy-hémoglobine.

Quant aux séries A', B', C', qui ont subi le traitement à l'Alcool méthylique, elles ne contiennent point de cristaux après 24 heures. Il y en a quelques-uns, minces, peu colorés, après 48 heures dans les mélanges *a*, *b*, *c*, qui ont subi l'action des sels, tandis que le mélange *d* ne contient que des dépôts.

L'action de l'Acétone qui avait été nulle sur la cristal-

lisation de l'oxyhémoglobine du Cheval, à la température de 0° est encore ici la même. Il y a précipitation de dépôts amorphes dans chacun des mélanges des séries A'', B'', C'', mais point de cristaux.

L'influence des Chlorures alcalino-terreux existe donc bien pour l'hémoglobine, comme pour l'oxyhémoglobine; et on peut les préparer sous forme cristallisée par les mêmes procédés (1).

(1) KUHNE. — *Das Vorkommen und die Ausscheidung des Hämoglobulins aus dem Blute*. Virchow's Archiv., T. XXXIV, p. 423 (1865).

WEDL. — *Ueber ein Verfahren zur Darstellung der Hämoglobinkrystalle*. Virchow's Archiv., T 80, p. 172 (1880).

NENCKI ET SIEBER. — *VENÖSE HÄMOGLOBINKRYSTALLE*. Ber. d. deutsch. chem. Ges., T. 19, p. 128 et 140 (1886).

CHAPITRE VIII.

Cristallisation simultanée de l'Hémoglobine et de l'Oxyhémoglobine.

Cette double influence de l'alcool et des chlorures alcalino-terreux sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine se manifeste plus nettement encore si on s'adresse à une solution contenant à la fois de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine, et non plus une seule de ces substances.

Avec un mélange semblable, et par l'action convenablement combinée de l'alcool et du chlorure, il est possible d'obtenir à la fois et des cristaux d'oxyhémoglobine et des cristaux d'hémoglobine. En faisant varier les proportions de réactifs employés, on préparera à volonté soit les uns, soit les autres. Nous avons vu que les chlorures alcalins ne favorisent pas la cristallisation de l'oxyhémoglobine, et que à ce point de vue leur action était complètement nulle. J'ai recherché s'ils se comportaient de la même manière avec l'hémoglobine, ou si, au contraire, on pouvait attendre de leur emploi des résultats pratiques.

Dans les expériences suivantes, j'étudierai donc simultanément l'action des chlorures alcalino-terreux et aussi celle des chlorures alcalins, en prenant pour type le Chlorure de Sodium. L'Alcool éthylique, l'Alcool méthylique, l'Acétone ne sont plus ajoutés dans la seule proportion de 1 vol. pour 4 vol. de la solution, mais je les ferai agir en quantités variables afin d'en déterminer avec une précision plus grande, l'action sur la cristallisation des matières colorantes du sang.

Expérience. — On a défibriné par battage du sang de Cheval, on l'a centrifugé; et les globules séparés du sérum et lavés à l'eau salée sont abandonnés pendant 6 jours à une température de + 6° environ. Des bactéries se sont développées pendant ce temps au sein de leur masse et ont consommé une certaine quantité de l'oxygène qui s'y trouvait. Les globules ont pris une couleur plus foncée et présentent une très légère odeur de putréfaction; il est alors facile de les laquer par addition de 1 vol. d'eau distillée pour 3 vol. de globules. La liqueur ainsi préparée contient à la fois et de l'oxyhémoglobine qui n'a pas été réduite parce que la fermentation n'a pas duré assez longtemps, et de l'hémoglobine produite précisément par ce commencement de putréfaction.

Les solutions salines, préparées à 1 %, sont alors ajoutées et dans les proportions de 1, 2, 5^{cc} pour 10^{cc} de globules laqués. A chacun des mélanges ainsi obtenus, on ajoute l'alcool dans des proportions variables.

Je prépare ainsi les séries A, A', A'' — B — C, C', C'', etc.

La série B ne contient pas de sels; elle servira donc de témoin.

Dans chacune de ces séries il y aura les 5 mélanges suivants :

SÉRIE A.

<i>a</i>	10 ^{cc} de glob. laqués	+ Ca Cl ²	1 ^{cc}	+ eau	4 ^{cc}	+ alcool éthylique	2 ^{cc}	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	2, 5
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	3 ^{cc}
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	3, 5
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	4 ^{cc}

SÉRIE A'.

<i>a</i>	10 ^{cc} de glob. laqués	+ Ca Cl ²	2 ^{cc}	+ eau	3 ^{cc}	+ alcool éthylique	2 ^{cc}	
<i>b</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	2, 5
<i>c</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	3 ^{cc}
<i>d</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	3, 5
<i>f</i>	10 ^{cc}	—	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	4 ^{cc}

SÉRIE D'.

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 2 ^{cc} de Ba Cl ² + eau 3 ^{cc} + alcool 2 ^{cc}						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	— 2, 5
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	— 3 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	— 3, 5
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	— 4 ^{cc}

SÉRIE D''.

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 5 ^{cc} de Ba Cl ² + alcool 2 ^{cc}						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	—	2, 5
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	—	3 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	—	3, 5
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	—	4 ^{cc}

SÉRIE E.

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 1 ^{cc} de Sr Cl ² + 4 ^{cc} d'eau + alcool 2 ^{cc}						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	— 2, 5
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	— 3 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	— 3, 5
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	1 ^{cc}	—	4 ^{cc}	—	— 4 ^{cc}

SÉRIE E'.

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 2 ^{cc} de Sr Cl ² + 3 ^{cc} d'eau + alcool 2 ^{cc}						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	— 2, 5
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	— 3 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	— 3, 5
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	2 ^{cc}	—	3 ^{cc}	—	— 4 ^{cc}

SÉRIE E''.

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + 5 ^{cc} de Sr Cl ² + 2 ^{cc} d'alcool						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	2, 5	—
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}	—
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	3, 5	—
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	5 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}	—

SÉRIE A''

<i>a</i> 10 ^{cc} de globules laqués + Ca Cl ² 5 ^{cc} + eau 0 + alcool 2 ^{cc}						
<i>b</i> 10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	2, 5
<i>c</i> 10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	3 ^{cc}
<i>d</i> 10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	3, 5
<i>f</i> 10 ^{cc}	—	—	5 ^{cc}	—	—	4 ^{cc}

SÉRIE B.

a 10^{cc} de globules laqués + eau 5^{cc} + alcool éthylique 2^{cc}

b 10^{cc} — — — 2, 5

c 10^{cc} — — — 3^{cc}

d 10^{cc} — — — 3, 5

f 10^{cc} — — — 4^{cc}

SÉRIE C.

a 10^{cc} de globules laqués + 1^{cc} de Na Cl + eau 4^{cc} + alcool 2^{cc}

b 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 2, 5

c 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 3^{cc}

d 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 3, 5

f 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 4^{cc}

SÉRIE C'.

a 10^{cc} de globules laqués + 2^{cc} de Na Cl + eau 3^{cc} + alcool 2^{cc}

b 10^{cc} — 2^{cc} — — 3^{cc} — 2, 5

c 10^{cc} — 2^{cc} — — 3^{cc} — 3^{cc}

d 10^{cc} — 2^{cc} — — 3^{cc} — 3, 5

f 10^{cc} — 2^{cc} — — 3^{cc} — 4^{cc}

SÉRIE C''.

a 10^{cc} de globules laqués + 5^{cc} de Na Cl + eau 0 + alcool 2^{cc}

b 10^{cc} — 5^{cc} — — — 2, 5

c 10^{cc} — 5^{cc} — — — 3^{cc}

d 10^{cc} — 5^{cc} — — — 3, 5

f 10^{cc} — 5^{cc} — — — 4^{cc}

SÉRIE D.

a 10^{cc} de globules laqués + 1^{cc} de Ba Cl² + eau 4^{cc} + alcool 2^{cc}

b 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 2, 5

c 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 3^{cc}

d 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 3, 5

f 10^{cc} — 1^{cc} — — 4^{cc} — 4

En remplaçant dans chacune de ces séries l'Alcool éthylique par l'Alcool méthylique, puis par l'Acétone ordinaire, on obtient toute une suite de mélanges nouveaux qui permettent d'étudier l'action de ces deux corps sur la cristallisation de l'oxyhémoglobine et de l'hémo-

globine, en présence des solutions diluées des Chlorures alcalins et alcalino-terreux.

Je laisse tous ces mélanges à la température de la glace fondante pendant 24 heures, et je les examine alors au microscope.

Dans la série A, le mélange *a* contient quelques cristaux d'oxyhémoglobine; dans les autres, il n'y a que des dépôts. Dans la série A' les mélanges *a* et *b* renferment un assez grand nombre de cristaux qui sont longs et très bien formés; le mélange *c* contient à la fois des cristaux d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine et des dépôts; le mélange *d* seulement des cristaux d'hémoglobine et des dépôts; enfin dans *f* il n'y a que des dépôts. Dans la série A'' il y a des dépôts dans *a*; des dépôts, des cristaux d'oxyhémoglobine dans *b*; seulement des cristaux d'hémoglobine et des dépôts dans *c* et *d*; et rien que des dépôts dans *f*.

Dans les séries B. C. C' C'' il y a seulement des dépôts. Ainsi après 24 heures d'un séjour à la température de 0°, les mélanges qui avaient reçu l'addition du Chlorure de Calcium contenaient des cristaux d'oxyhémoglobine; dans ceux qui n'en contenaient point, il n'y a pas la moindre cristallisation.

Il semble qu'il y ait deux phases dans cette production des formes cristallines. L'Alcool employé en faible quantité, 2^{cc} et 2^{cc},5 pour 15^{cc} du mélange salé, fait cristalliser l'oxyhémoglobine sans agir sur l'hémoglobine; puis les quantités d'Alcool allant en augmentant, on obtient exclusivement de l'hémoglobine et des dépôts amorphes d'oxyhémoglobine dans chacun des mélanges *d* et *f*, en passant par un stade intermédiaire, celui où l'Alcool (mélange *c*) fait cristalliser à la fois l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine.

La proportion de sel employé a aussi son importance :

les séries A A' A'' ne diffèrent l'une de l'autre que par les quantités de CaCl^2 qu'elles ont reçues ; et la cristallisation ne s'est pas opérée de la même façon dans chacune d'elles :

Dans la série A, un seul mélange *a* a donné des cristaux, tandis que les mélanges de A' et A'' en renferment presque tous.

On dirait que le sel se comporte comme l'alcool, et que son action se superpose à la sienne. Pour faire cristalliser l'hémoglobine, il faut une quantité d'alcool plus grande que pour faire cristalliser l'oxyhémoglobine. L'emploi du Chlorure de Calcium permet cependant, si on l'ajoute en quantité convenable, d'obtenir l'hémoglobine sous forme cristallisée avec des proportions d'alcool très faibles, et qui sans l'addition de quantités aussi élevées de sel n'auraient produit que la formation de cristaux d'oxyhémoglobine. C'est ainsi que dans la série A' les seuls mélanges *c* et *d* contiennent de l'hémoglobine cristallisée, alors que dans la série A'' où il y a eu 5^{cc} de Chlorure de Calcium au lieu de 2^{cc}, le mélange *b* en renferme aussi ; et que dans les suivants *c* et *d* il y a uniquement de ces cristaux et pas un seul d'oxyhémoglobine.

Du reste, pour ce sel, comme pour l'alcool, il y a une limite qu'il ne faut pas dépasser et au delà de laquelle on ne produit plus de cristallisation, mais seulement une précipitation sous forme de dépôts amorphes.

Les résultats ne sont pas rigoureusement les mêmes avec les Chlorures de Baryum et de Strontium, qui ont cependant une action très analogue à celle du Chlorure de Calcium.

Dans la série D — après 24 heures — il y a des cristaux d'oxyhémoglobine dans les mélanges *a* et *b*, les autres mélanges *c d f*, ainsi que tous ceux des séries D'

et D'' renferment seulement des dépôts. L'action du sel est ici trop brutale: les seuls mélanges *a* et *b* de la série D dans lesquels les proportions d'alcool et de sel sont très faibles contiennent des cristaux : dans ces deux cas, les réactifs: alcool et sel ont pu agir d'une façon modérée; tandis que dans tous les autres mélanges, leur action a été violente, ce qui a provoqué une précipitation rapide du pigment sanguin, et en a empêché la cristallisation.

L'action du Chlorure de Strontium serait moins vive, et il serait difficile avec lui d'obtenir les cristaux d'hémoglobine sans employer une grande quantité de sel; au contraire, ceux d'oxyhémoglobine se formeraient plus facilement. Ainsi dans la série E, il n'y a que des dépôts; mais dans la série E' qui contient plus de sel on trouve des cristaux d'oxyhémoglobine dans *a*, *b*, *c*, *d*, avec des dépôts; dans *f* il n'y a que des dépôts. Dans la série E'' le sel étant encore plus abondant : 5^{cc} au lieu de 1^{cc} et 2^{cc}, les cristaux d'oxyhémoglobine sont beaucoup plus rares; et ceux d'hémoglobine, au contraire, plus nombreux : dans les mélanges *a* et *b* il y a des dépôts et des aiguilles cristallines d'oxyhémoglobine; dans *c*, des cristaux d'oxyhémoglobine et d'autres d'hémoglobine; enfin, dans *f* et *d* il y a outre les dépôts un très grand nombre de cristaux d'hémoglobine.

Après 48 heures, la température s'étant élevée à + 3°, je fais un nouvel examen microscopique :

Les séries B. C. C' C'' contiennent seulement des dépôts, et pas la moindre forme cristalline.

Dans la série A, le mélange *a* contient un assez grand nombre de cristaux d'oxyhémoglobine et de dépôts; dans *b*, il y a à la fois cristaux d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine et des dépôts; dans *c* les cristaux d'oxyhémoglobine sont plus rares; dans *d*, il y a seulement des cristaux d'hémoglobine; enfin, dans *f* il n'y a que des dépôts.

Dans la série A', les mélanges *a* et *b* contiennent des cristaux énormes, très nets d'oxyhémoglobine, avec en plus, dans *b*, des cristaux d'hémoglobine; dans *c*, *d*, *f* il y a seulement des cristaux, et en très grand nombre, d'hémoglobine : dans tous il y a des dépôts.

Dans la série A" où le Chlorure de Calcium est le plus abondant, on a quelques rares cristaux d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine dans le mélange *a*; dans tous les autres il y a seulement des cristaux d'hémoglobine et des dépôts.

Cette cristallisation, qui pour l'oxyhémoglobine est en raison inverse, et pour l'hémoglobine, en raison directe des quantités d'alcool employées, se produit d'une façon presque identique, soit par le Chlorure de Strontium, soit par le Chlorure de Baryum qui la veille n'avait donné que très peu de cristaux et beaucoup de dépôts amorphes.

Le mécanisme général de la cristallisation semble ici se manifester d'une manière toute particulière.

Après 24 heures de contact, l'alcool et le sel agissent sur les matières colorantes des globules, et leur action étant brusque, en déterminent la précipitation sous forme de dépôts. Il en résulte une diminution de la richesse saline et alcoolique du mélange; et l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine qu'il contenait et qui n'ont pas été atteintes dès le début, subiront à leur tour, mais peu à peu, progressivement, avec lenteur, l'action des réactifs qui les feront cristalliser.

On n'observe plus les mêmes phénomènes dans les séries où l'Alcool éthylique a été remplacé par l'Acétone. Dans ce cas, et malgré la présence des sels, l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine refusent de cristalliser, à la température à laquelle ont eu lieu mes expériences.

Quant à l'Alcool méthylique, son action se rapproche

d'avantage de celle de l'Alcool éthylique. Après 24 heures, les mélanges qui en contiennent n'ont subi aucune modification ; mais après 48 heures, on aperçoit des cristaux d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine dans les séries traitées par les Chlorures de Baryum, de Calcium et de Strontium : il n'y a, au contraire, que de fines et rares aiguilles d'oxyhémoglobine dans les autres : l'influence de l'alcool et du sel est ici moins manifeste que dans le cas de l'Alcool éthylique : les cristaux sont plus petits, plus minces, moins nombreux, mais cependant l'action des Chlorures alcalino-terreux est encore très certaine.

De ces expériences résultent plusieurs faits intéressants :

1° A une température comprise entre 0° et + 3° il est possible de faire cristalliser l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine à la condition d'ajouter à leur solution, avant de les traiter par l'alcool, une certaine proportion de chlorures alcalino-terreux. L'action de ces corps sur ces cristallisations est plus ou moins lente, plus ou moins active, mais très sensiblement identique, quel que soit le chlorure employé. Si l'on s'est servi d'un chlorure alcalin, au contraire, la cristallisation ne s'effectue pas, Pour le sang de Cheval, en particulier, on peut prendre, soit l'Alcool méthylique, soit l'Alcool éthylique, mais ce dernier est préférable. Quant à l'Acétone ordinaire, son action serait sans effet.

2° On peut déterminer à la fois la production de cristaux d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine, en se servant des mêmes quantités soit de sel, soit d'alcool.

3. Pour faire cristalliser l'hémoglobine, il faut une quantité d'alcool plus grande que pour faire cristalliser l'oxyhémoglobine, l'alcool pouvant d'ailleurs être remplacé en partie par une addition nouvelle du sel.

Il est néanmoins impossible d'indiquer les quantités soit de chlorure, soit d'alcool à employer, pour arriver à préparer ces cristaux, à cause de la complexité des phénomènes de putréfaction qui réduisent l'oxyhémoglobine et la transforment en hémoglobine.

CHAPITRE IX

Des formes cristallines de l'Oxyhémoglobine et de l'Hémoglobine.

Nous avons parlé jusqu'ici des différents procédés qui permettent de faire cristalliser l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine, mais nous n'avons point indiqué les formes que ces cristaux affectaient,

Cette étude cristallographique est tout particulièrement délicate, à cause de la nature même de ces substances. Les caractères extérieures qui sont d'un emploi très précieux dans la détermination des espèces cristallines, tels que la dureté, le clivage, la flexibilité, la fusibilité, les conductibilités calorifique et électrique, etc., ne pourront être bien utiles ici. Les réactions micro-chimiques qui amèneraient une décomposition de la matière colorante ne nous seront également d'aucun secours. De plus les dimensions des cristaux sont beaucoup trop petites pour permettre de les examiner à l'œil nu ; et les mesures angulaires ne pourront dès lors être effectuées à l'aide du goniomètre. La seule méthode possible sera donc la méthode microscopique. Mais ici de nouvelles difficultés se présentent. Les cristaux d'oxyhémoglobine retirés de la liqueur dans laquelle ils se sont développés, se désagrègent très rapidement, en donnant de petites masses granuleuses, amorphes qui constituent les dépôts que nous avons obtenus lorsque la température était trop

élevée ou que les précipitants (alcools ou sels) étaient employés en trop grande ou trop petite quantité.

Il faudra donc observer ces cristaux dans la liqueur alcoolique elle-même, en en prélevant une goutte que l'on étendra sur une lamelle de verre.

Ces conditions sont encore rendues plus défectueuses par les mouvements des cristaux qui tourbillonnent avec une grande rapidité dans le liquide ; et lorsqu'ils deviennent immobiles, le cristal ne tarde pas à se disloquer en petits fragments qui n'ont plus aucune forme géométrique. Il faut ainsi renoncer, presque complètement, à l'examen des propriétés optiques, source cependant si précieuse de renseignements : tout au plus est-il possible de s'assurer que ces cristaux sont des corps bi-réfringents, et n'appartiennent donc point au système cubique.

Malgré toutes ces difficultés, on n'en a pas moins donné la description des cristaux d'oxyhémoglobine du sang d'un grand nombre d'animaux. A la vérité, les déterminations de toutes ces formes cristallines, sont un peu sommaires ; mais il était difficile qu'il en fût autrement à cause des conditions tout particulièrement défavorables dans lesquelles on a dû les exécuter.

C'est ainsi que Funke nous apprend, mais sans plus de détails, que les cristaux d'oxyhémoglobine de l'Homme sont des rectangles, que ceux du Lion et du Chat sont des prismes ortho-rhombiques, ceux de la Souris de fines aiguilles, et des tables hexagonales ; ceux du Pore, des prismes en petites aiguilles ; ceux du Lombric, des aiguilles ; ceux de la Carpe, des écailles, etc... Il affirme, sans en donner aucune preuve, que les diverses oxyhémoglobines cristallisent toutes, soit dans le système du prisme hexagonal, soit dans celui du prisme droit à base rhombe.

Ne serait-il pas plus logique, dans l'ignorance où nous sommes des axes optiques de ces cristaux, de les rattacher tous à un même système cristallin. puisqu'il est possible de les faire dériver, et d'une manière toute naturelle, du seul prisme orto-rhombique ? C'est à ce résultat que nous nous arrêtons dans l'examen des formes cristallines obtenues dans les expériences précédentes.

L'addition d'eau distillée aux globules lavés de sang d'Écureuil, nous a donné à la température du laboratoire, des cristaux extrêmement minces, rose pâle, presque incolores, d'un éclat soyeux. Ce sont des hexagones : les uns réguliers, d'autres irréguliers. On a dit que c'étaient des tablettes rhomboédriques ; et, en effet, la troncature très profonde, poussée jusqu'à la limite, des deux angles culminants du rhomboèdre, celles de ses arêtes latérales ou des six angles latéraux combinées avec celle des angles culminants, peuvent bien donner des formes hexagonales, mais les hexagones ainsi obtenus ne sont plus quelconques, ils sont réguliers et leurs côtés et leurs angles sont donc toujours égaux entre eux.

Il est ainsi impossible d'attribuer cette dérivation aux formes que nous avons obtenues, puisque dans bien des cas, l'égalité des angles n'existe plus : deux étant plus ou moins obtus. tandis que les autres sont aigus.

Si l'on admet l'hypothèse du prisme hexagonal, on aurait, suivant le cas, ou la face supérieure p du prisme primitif, ou la face latérale m du même prisme, dont les angles auraient été tronqués, et de telle sorte que les lignes de troncature se coupent deux à deux, soit au milieu des arêtes basiques b , soit au milieu des arêtes latérales h .

Mais il est plus simple de faire dériver ces hexagones, réguliers ou irréguliers, du prisme ortho-rhombrique, par simple troncature de deux des arêtes latérales, soit h ,

soit g , qui transformera le prisme primitif à quatre faces latérales, en un deuxième, où ces faces seront au nombre de six, et dont les faces basiques seront des hexagones quelconques, pouvant être réguliers, mais aussi irréguliers.

Avec le sang du Chien, les formes cristallines sont plus nombreuses et varient avec la dilution de la liqueur, la température, la quantité d'alcool employé, la richesse en oxyhémoglobine du sang soumis à l'observation, etc. On obtient très facilement des aiguilles cristallines de couleur rouge vif, brillantes, soyeuses, longues parfois de un demi centimètre, et se terminant fréquemment en pointe. Il est impossible, à un fort grossissement, d'y reconnaître des faces, des angles ou des arêtes.

À côté de ces aiguilles, on trouve des tables rectangulaires ou quelquefois rhombiques, qui ne sont autre chose que les faces latérales m et basiques p du prisme ortho-rhombique. Une forme très fréquente encore, est celle de l'hexagone irrégulier, très allongé et très étroit, et qui serait une face basique du prisme primitif, dont deux des arêtes latérales h ou g , auraient supporté une troncation.

Le sang du Bœuf laisse très difficilement cristalliser son oxyhémoglobine : pour la préparer, nous avons dû opérer à une température de -10° , et faire le laquage par l'éther seul ou par refroidissement. Les cristaux ainsi obtenus, sont très gros, bien visibles à l'œil nu, plusieurs ont un centimètre de long, sur un demi-centimètre de large. Ce sont ou des cristaux rectangulaires, ou des cristaux à six pans, assez semblables, comme formes, à ceux que nous venons d'étudier chez le Chien, mais qui sont beaucoup plus volumineux. Ce seraient, soit les faces latérales m , soit les faces basiques p du prisme ortho-rhombique, modifié par troncation de deux des arêtes latérales.

Avec le sang du Cheval, on retrouve à peu près les mêmes formes, mais il est beaucoup plus facile de les préparer. Ce sont, soit des aiguilles rouge vif, brillantes, quelquefois longues de un centimètre, groupées en houppes soyeuses, soit des prismes à quatre faces, qui ont l'allure de prismes quadratiques. mais qu'il est facile de faire dériver du prisme rhombique, par troncature simultanée des arêtes h et g , et faites de telle sorte que les quatre faces m du primitif soient supprimées, et que l'on arrive au deutéropisme $p\ h^1\ g^1$. Ce prisme n'existe pas toujours complètement formé, et quelquefois, on n'en aperçoit qu'une des faces, qui présente l'aspect d'une lame rectangulaire.

Il existe une autre forme assez fréquente, et qui résulte directement, soit de la troncature des angles a , soit de celle des angles e du prisme ortho-rhombique. Ces angles sont alors remplacés par des facettes triangulaires, et les faces basiques du prisme ne sont plus des rhombes, mais des hexagones; et c'est là un fait qui vient victorieusement à l'appui de notre hypothèse, que les cristaux d'oxyhémoglobine, dérivent tous du prisme ortho-rhombique.

Quelquefois, la troncature de ces angles est assez profonde, pour que les faces supérieure et inférieure soient complètement supprimées et remplacées par deux faces triangulaires, constituant un toit dont la ligne de faite se confond, soit avec la petite diagonale, soit avec la grande diagonale de la face rhombique primitive; et on a ou le macrodôme a^1 ou le brachydôme e^1 .

Ailleurs, les formes sont plus compliquées: outre les quatre troncatures symétriques des angles, deux des arêtes latérales ont aussi été tronquées, et le nouveau prisme ainsi obtenu n'a plus quatre faces latérales, mais six, et ses extrémités sont toujours terminées en dôme.

L'oxyhémoglobine du Poulet présente des formes beaucoup plus simples. Si elle a été obtenue à l'aide de l'Alcool éthylique, elle a l'apparence de petits bâtonnets, rouge foncé, mais qui deviennent des cristaux rectangulaires très nets, dont les arêtes et les angles sont parfaitement accusés, si on remplace l'Alcool éthylique par l'Alcool méthylique. En restant dans l'hypothèse du système ortho-rhombique, ces cristaux seraient les faces latérales *m* du prisme primitif. Nous ne les avons trouvés décrits nulle part, et cela tient sans doute au manque de netteté des cristaux que l'on cherchait à préparer seulement par l'Alcool éthylique.

Les cristaux d'hémoglobine ont une allure toute différente. Leur couleur est beaucoup plus foncée, ils sont rouge noir, si leur épaisseur est assez grande, et rouge violacé, si elle est très faible ; leur éclat est aussi moins vif que celui des cristaux d'oxyhémoglobine.

La difficulté de les étudier est encore plus grande. Au contact de l'air, en effet, l'hémoglobine est détruite et ses cristaux se désagrègent, se déforment, puis se dissolvent très rapidement dans le liquide qui les baigne en lui donnant la coloration rouge vif de l'oxyhémoglobine.

Nous avons pu préparer ces cristaux avec les sangs putréfiés du Cheval et du Poulet, en nous servant soit de l'Alcool méthylique, soit de l'Alcool éthylique. Ils sont volumineux, et ont quelquefois jusqu'à un centimètre de diamètre ; souvent groupés en masse au fond des tubes où a lieu l'expérience, ils se présentent comme imbriqués les uns sur les autres, ainsi que le font les tuiles d'un toit. Les seules formes obtenues sont des hexagones, les uns réguliers, d'autres irréguliers, et qu'il est facile de faire dériver du prisme ortho-rhombique, comme nous l'avons montré en particulier pour les cristaux d'oxyhémoglobine d'Ecureuil.

De l'étude nécessairement superficielle de ces divers cristaux, on peut conclure que si les oxyhémoglobines des diverses espèces animales n'ont pas toutes des formes rigoureusement identiques, on peut cependant les faire dériver normalement d'une même forme primitive: le prisme ortho-rhombique.

L'étude que nous avons faite des formes cristallines de l'oxyhémoglobine des sangs de Cheval, de Bœuf, de Poulet, de Chien en particulier, conduit très nettement à la conclusion suivante. La forme cristalline ne permet pas de reconnaître l'espèce animale dont provient le sang, car pour un même sang on obtient suivant les circonstances de la cristallisation, des formes cristallines différentes, et inversement pour des sangs d'espèces différentes, on obtient des formes cristallines qu'il est difficile, souvent même impossible de distinguer. Ce n'est que dans des cas exceptionnels qu'on peut baser la reconnaissance de la nature du sang, sur l'examen des cristaux de sa matière colorante. Si, par exemple, on a à rechercher si des cristaux d'oxyhémoglobine proviennent du sang de l'Homme, ou du sang de l'Écureuil, on est autorisé à conclure, si ces cristaux sont des tablettes hexagonales, parce qu'on n'a jamais obtenu de telles formes en partant du sang de l'homme.

Quelques auteurs ont supposé que les cristaux de l'oxyhémoglobine résultent d'une combinaison du pigment sanguin avec l'alcool précipitant; il y aurait dans cette formation quelque chose d'analogue à ce qui se produit dans l'éthérification: l'acide serait ici la matière colorante; et le mécanisme de la réaction serait le même avec une vitesse et une limite variables avec la température.

Les expériences de cristallisation faites avec l'Alcool méthylique, l'Acétone et les chlorures alcalino-terreux

permettent de rejeter cette conclusion. On obtient, en effet, les mêmes formes cristallines, par addition de l'un quelconque des agents précipitants, toutes conditions étant égales par ailleurs. Or, nous avons vu que des variations dans les proportions d'oxyhémoglobine, des variations de température, etc., provoquent des modifications de la forme cristalline. C'est donc que cette forme cristalline est très sensible aux modifications physiques et chimiques du milieu ambiant. Ne devraient-elles pas varier encore davantage, si la substance cristallisée résultait de la combinaison du pigment sanguin avec l'agent précipitant. On comprendrait que l'Alcool méthylique puisse remplacer l'Alcool éthylique et former une combinaison isomorphe; on ne le comprendrait plus au contraire en employant l'Acétone.

Nous admettrons donc que la substance cristallisée représente le pigment sanguin lui-même, et non pas quelqueune de ses combinaisons.

Bibliographie. — FUNKE. *De sanguine venæ lienalis*. Inaug. Diss Leipzig, 1851 et Zeitschrift, f., ration. Med., T. I, p. 185 (1851) et T. II, p. 200 (1852).

PREYER. — *Die Blutkrystalle*. Iéna, 1871.

OTTO. — *Ueber das Oxyhamoglobin des Schweines*. Zeitsch, f., physiol, chem, VII, p. 57, 1882.

OTTO. — *Beitrage zur Kenntniss der Blutfarbstoffe*. Pflüger's, Archiv. T. XXXI, p. 240 (1883).

CHAPITRE X.

Quelques propriétés de l'Oxyhémoglobine et leur signification.

L'oxyhémoglobine constitue un terme de passage entre les substances colloïdes et les cristalloïdes : elle est colloïde par certaines de ses propriétés ; elle est cristalloïde par les autres. Les faits que nous rapportons et que nous discutons fournissent la justification de cette proposition.

1° L'oxyhémoglobine peut s'obtenir sous forme cristalline, et par ce caractère, elle est un cristalloïde. Toutefois une réserve doit être faite. Si l'oxyhémoglobine de certaines espèces animales cristallise assez facilement, d'autres oxyhémoglobines ne cristallisent qu'avec une extrême difficulté. Ces dernières, dont on peut cependant avoir des cristaux, ne diffèrent pas dès lors sensiblement de certaines substances protéiques. On sait, en effet, que plusieurs albuminoïdes végétales ont pu être préparées sous forme cristalline, et que l'ovalbumine et la sérumalbumine elles-mêmes ont été obtenues sous forme cristallisée.

On peut dire que les oxyhémoglobines, au point de vue de la cristallisation forment une série ininterrompue entre les véritables cristalloïdes et les substances albuminoïdes cristallisables.

2° L'oxyhémoglobine ne dialyse pas à travers le papier colloïde parchemin, et c'est là un caractère colloïde.

Cette proposition n'a pas toujours été considérée comme vraie. Hüfner (1) a prétendu en effet que l'oxy-

HÜFNER. *Ueber Krystallinisches Hämoglobin*. Zeitsch-f-physiolo. Chem. T. IV, fas. 5 (1880).

hémoglobine cristallisée possède la propriété de dialyser lorsqu'elle a été redissoute dans l'eau.

L'oxyhémoglobine, telle qu'elle existe dans le globule ou dans le liquide de laquage des globules ne dialyse pas ; on sait qu'elle permet facilement de vérifier le bon fonctionnement d'un dialyseur. Quand on veut s'assurer qu'une membrane dialysante ou qu'un boyau dialyseur ne présente aucun orifice, on introduit dans ce dialyseur une solution de globules laqués, et on le plonge dans un vase contenant de l'eau en maintenant le niveau du liquide dans le dialyseur, de quelques centimètres au-dessus du niveau du liquide extérieur. Si le dialyseur est parfait, le liquide extérieur ne prend pas la teinte rouge de l'oxyhémoglobine.

En est-il de même après que l'oxyhémoglobine a été cristallisée ? Pour nous en assurer, nous avons fait les expériences suivantes : on a fait cristalliser de l'oxyhémoglobine de Cheval. Les cristaux formés ont été séparés par filtration sur papier, puis redissous dans l'eau distillée. Cette solution d'oxyhémoglobine a été introduite dans un boyau dialyseur et celui-ci plongé dans l'eau distillée à la température du laboratoire. Après 8 à 10 jours, le liquide extérieur est complètement incolore.

Pour éviter les phénomènes de putréfaction qui pourraient se produire pendant cette dialyse prolongée à la température du laboratoire, nous avons de même soumis à la dialyse une solution d'oxyhémoglobine de sang de Chien dans le fluorure de sodium à 1 %. Après 10 jours le liquide extérieur ne présente pas la moindre trace de coloration.

Nous dirons donc que l'oxyhémoglobine, qu'elle soit sous la forme qu'elle a dans les globules ou qu'elle ait été cristallisée, est absolument indialysable.

C'est là un caractère remarquable, puisque l'oxyhémoglobine peut être obtenue cristallisée et très facilement dans le cas du sang d'Ecureuil, de Chien et même de Cheval. C'est un caractère qui la rattache aux substances colloïdes, si sa cristallisation l'en écarte.

3° L'oxyhémoglobine, comme les substances protéiques, et en général comme les substances colloïdes, est partiellement retenue par les filtres de porcelaine dégourdie.

On a préparé des cristaux d'oxyhémoglobine de sang de Cheval et on les dissout dans l'eau distillée. On fait filtrer cette solution à travers une bougie de porcelaine dégourdie de Chamberland en s'aidant d'une pression de 4 ou 5 atmosphères obtenue en comprimant de l'air dans l'enceinte contenant la solution d'oxyhémoglobine. La filtration se fait avec une assez grande lenteur, mais on obtient sans peine des quantités de liquide largement suffisantes pour y doser l'oxyhémoglobine par le procédé colorimétrique. On déterminera donc, à l'aide d'un colorimètre de Laurent, le pouvoir colorant de la solution d'oxyhémoglobine, avant la filtration et après la filtration. On trouve ainsi que la liqueur examinée, avant filtration, sous une épaisseur de 2^{cm}35 a le même pouvoir colorant que la liqueur après filtration, examinée sous une épaisseur de 3^{cm}. Donc les proportions d'oxyhémoglobine sont comme les nombres 300 et 235 ou sensiblement 100 et 78 : on peut donc dire que 78 % de l'hémoglobine ont filtré et que 22 % ont été retenus par le filtre.

Pourquoi cette rétention d'oxyhémoglobine ? Faut-il supposer que l'hémoglobine se trouve sous deux états dans la solution : état de dissolution vraie, et état de suspension, et que le filtre sépare l'hémoglobine en suspension de celle qui est en solution ? S'il en était ainsi,

la liqueur oxyhémoglobinée après filtration sur porcelaine dégourdie pourrait être filtrée de nouveau et cette fois sans perte de matière colorante. Or, il n'en est rien. Si nous filtrons une seconde fois la solution d'oxyhémoglobine, nous constatons qu'elle perd encore de sa matière colorante. Après une deuxième filtration, il faut examiner la liqueur sous une épaisseur de 3^{cm}25 pour avoir la même coloration que celle obtenue en examinant la liqueur de première filtration sous une épaisseur de 3^{cm}.

Nous avons fait subir au liquide coloré une troisième et une quatrième filtration. Le tableau ci-dessous indique les épaisseurs équivalentes au point de vue colorimétrique des liquides successivement obtenus.

Solution avant filtration.....	2 ^e 35
Solution après une 1 ^{re} filtration	3 ^e 00
— 2 ^e —	3 ^e 25
— 3 ^e —	5 ^e 00
— 4 ^e —	17 ^e 00

D'où nous pouvons conclure en désignant par λ la quantité d'oxyhémoglobine contenue dans l'unité de volume de la solution primitive, que les quantités de matière colorante contenues dans les liquides successifs de filtration sont :

Avant filtration..	λ
Après 1 filtration	$0,78 \lambda = \lambda'$
Après 2 filtrations	$0,72 \lambda = 0,92 \lambda' = \lambda''$
— 3 —	$0,47 \lambda = 0,60 \lambda' = 0,65 \lambda'' = \lambda'''$
— 4 —	$0,13 \lambda = 0,17 \lambda' = 0,18 \lambda'' = 0,29 \lambda''' = \lambda''''$

Les quantités d'oxyhémoglobine retenues par le filtre ont été :

Après 1 filtration de 22 % de la quantité primitive	
— 2 —	28 %
— 3 —	53 %
— 4 —	87 %

Donc après chaque filtration, une nouvelle portion d'oxyhémoglobine est retenue. On ne peut donc pas trouver là une démonstration de l'existence de l'oxyhémoglobine sous deux états dans la solution primitive. Il est plus simple d'admettre que toute l'oxyhémoglobine y est sous un même état et que le filtre possède la propriété de retenir une certaine proportion de la substance colorante comme il retient une certaine proportion des substances albuminoïdes et, en général, des substances colloïdes.

Par les résultats des expériences de filtration sur porcelaine dégourdie, l'oxyhémoglobine nous apparaît comme une véritable substance colloïde.

4° Lorsqu'on soumet à une dialyse prolongée, en présence d'eau distillée fréquemment renouvelée, une solution d'ovalbumine ou de sérumbalbumine jusqu'à élimination aussi complète que possible des matières minérales, on obtient une solution albumineuse qui n'est plus coagulable par la chaleur ou précipitable par l'alcool. Pour lui rendre sa coagulabilité ou sa précipitabilité normales, il est nécessaire de lui ajouter de petites quantités de sels neutres, substances cristalloïdes.

Soumettons de même à la dialyse prolongée, en présence d'eau distillée renouvelée à plusieurs reprises, une solution d'oxyhémoglobine en opérant à température peu élevée pour éviter toute transformation d'origine microbienne, et examinons les propriétés de la liqueur colorée : elle conserve ses réactions normales vis-à-vis de la chaleur et de l'alcool.

De l'oxyhémoglobine de Cheval, préparée en partant de globules centrifugés, lavés, laqués et traités par l'alcool, est dissoute dans de l'eau distillée, et cette liqueur est introduite dans un dialyseur de Kühne en présence de 10 à 12 vol. d'eau distillée. L'eau exté-

rieure est renouvelée deux fois par jour et pendant 8 jours, jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus de chlorure, même des trace de chlorure. On soumet alors à l'action de la chaleur un échantillon du liquide intérieur ; on constate qu'il se produit un coagulum et que la teinte passe du rouge au brun foncé, comme cela se produit pour la solution d'oxyhémoglobine avant toute dialyse. Si on traite la solution d'oxyhémoglobine par un excès d'alcool on précipite ce pigment sous forme floconneuse, aussi bien dans la solution dialysée que dans celle qui ne l'a pas été.

Donc la dialyse ne fait pas perdre à l'oxyhémoglobine ses propriétés d'ordre colloïde comme elle fait perdre celles d'une solution d'albumine. Dans ces expériences, les choses se passent comme si une partie de l'oxyhémoglobine jouait le rôle de cristalloïde, l'autre partie fonctionnant comme colloïde ; ou bien comme si l'oxyhémoglobine jouissait à la fois de propriétés colloïdes (coagulation, précipitation) dont la manifestation est possible dans les solutions dialysées, grâce au caractère cristalloïde de cette substance.

5° On peut encore faire un rapprochement entre l'oxyhémoglobine et les substances colloïdes en comparant l'action exercée dans leurs changements d'état par les sels alcalino-terreux. On sait que les sels de chaux, et en général les sels alcalino-terreux possèdent à un degré beaucoup plus élevé que les sels neutres d'alcalis, la propriété de favoriser les changements d'état (précipitation et coagulation) des substances colloïdes. Les sels de chaux en particulier favorisent la coagulation des albumines et des globulines par la chaleur, la caséification du lait, et la coagulation du sang. Nous avons vu que l'oxyhémoglobine cristallise plus facilement en présence de petites quantités de sels alcalino-terreux introduits dans sa solution aqueuse.

Ce fait est intéressant et important : nous avons vu, en effet que l'addition d'un excès d'alcool à la liqueur dont on veut précipiter l'oxyhémoglobine n'est pas toujours avantageuse, car elle donne lieu à la formation de dépôts amorphes. Mais il semble bien que si on ajoute un peu de sel de chaux, sans augmenter la proportion d'alcool, la cristallisation est activée et que les formes obtenues sont à la fois plus nombreuses et plus nettes.

En résumé, par quelques-uns de ses caractères, l'oxyhémoglobine est une substance cristalloïde ; par d'autres elle est colloïde ; et c'est ce double caractère que nous venons d'essayer de mettre en lumière qui donne à cette substance un si grand intérêt chimique.

HOPPE-SEYLER. — *Ueber die optischen und chemischen Eigenschaften des Blutfarbstoffes* (Ctrbl. für. d. med. Wiss., 1864, p. 817 et 834).

HOPPE-SEYLER. — *Beiträge zur Kenntniss der Eigenschaften des Blutfarbstoffes* (Zeitschr. f. physiol. chem., t. XIII. p. 477, 1889).

RESUME

1° Dans la préparation des cristaux d'oxyhémoglobine, il y a toujours avantage à laquer les globules, et par la dilution la plus petite possible : la précipitation cristalline se faisant d'autant mieux que la solution d'oxyhémoglobine est plus concentrée.

L'éther est avantageux à employer parce qu'il permet le laquage sans dilution notable et seulement pour cette condition, car par lui-même l'éther joue un rôle défavorable dans la cristallisation.

2° Il existe pour chaque solution d'oxyhémoglobine une quantité d'alcool optima (c'est-à-dire provoquant la cristallisation d'une plus grande quantité d'oxyhémoglobine, sans mélange de dépôts amorphes).

3° On peut substituer à l'Alcool éthylique comme agent précipitant, soit l'Alcool méthylique, soit l'Acétone, d'une façon générale les résultats fournis par l'Alcool éthylique sont les meilleurs.

4° La présence d'une petite quantité de sels alcalino-terreux favorise la cristallisation de l'oxyhémoglobine (c'est-à-dire permet d'obtenir des cristaux plus volumineux, plus nombreux et de les obtenir à une température moins basse que celle généralement nécessaire). Les sels neutres d'alcalis ne possèdent pas le même pouvoir favorisant.

5° On peut obtenir l'hémoglobine cristallisée sous forme de tablettes hexagonales, en traitant par l'alcool des globules de sang putréfiés et laqués.

6° Dans une liqueur contenant à la fois de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine, on peut au moyen de l'Alcool éthylique ou de l'Alcool méthylique employé

comme précipitants, obtenir des cristaux de l'un et l'autre pigment. Cette cristallisation est favorisée par addition de petites quantités de sels alcalino-terreux.

7° Les différentes formes cristallines observées avec l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine peuvent se ramener à une même forme fondamentale, celle du prisme orthorhombique.

8° Par ces propriétés, l'oxyhémoglobine est à la fois colloïde et cristalloïde : elle constitue un terme de passage remarquable entre les deux groupes de substances colloïdes et cristalloïdes.

Vu bon à imprimer :

Le président de la thèse,

Em. BOURQUELOT.

Vu : *Le directeur de l'École,*

G. PLANCHON.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Université de Paris,

GRÉARD.

